

(19) KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030060772 A
 (43)Date of publication of application:
 16.07.2003

(21)Application number: 1020027014814	(71)Applicant: GTC BIOTHERAPEUTICS, INC.
(22)Date of filing: 05.11.2002	INTEGRA LIFESCIENCES CORP.
(30)Priority: 05.05.2000 1	(72)Inventor: MEADE HARRY M.
	PIERSCHBACHER
	MICHAEL
(51)Int. Cl. A61K 38/16	

(54) TRANSGENICALLY PRODUCED DECORIN

(57) Abstract:

Transgenically produced decorin and methods of making and using transgenically produced decorin.

copyright KIPO & WIPO 2007

Legal Status

Date of request for an examination (00000000)

Notification date of refusal decision ()

Final disposal of an application (withdrawal)

Date of final disposal of an application (20060505)

Patent registration number ()

Date of registration ()

Number of opposition against the grant of a patent ()

Date of opposition against the grant of a patent ()

Number of trial against decision to refuse ()

Date of requesting trial against decision to refuse ()

Date of extinction of right ()

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.⁷
A61K 38/16

(11) 공개번호
(43) 공개일자
특2003-0060772
2003년07월16일

(21) 출원번호 10-2002-7014814
(22) 출원일자 2002년11월05일
번역문 제출일자 2002년11월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2001/14408
(86) 국제출원출원일자 2001년05월04일

(87) 국제공개번호 WO 2001/85192
(87) 국제공개일자 2001년11월15일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 슬리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구아바루다, 코스타리카, 도미니카연방, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 그레나다, 가나, 크로아티아, 인도, 유고슬라비아, 짐바브웨, 감비아, 인도네시아, 시에라리온, 모잠비크, 콜롬비아,

AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 짐바브웨, 감비아, 모잠비크, 탄자니아,

EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,

EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스웨덴, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터키,

OA OAPI특허: 부르키나파소, 베냉, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기네비소,

(30) 우선권주장 60/201,932 2000년05월05일 미국(US)

(71) 출원인

지티제바이오세라퓨틱스,인크.
미국 메사추세츠주 01701-9322 프래밍햄 크로싱 블바드 175
인티그라 라이프사이언시스 코프.
미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 로켈 스트리트 11045

(72) 발명자

미드 해리 엠
미국 메사추세츠 02158 뉴튼 그래스미어 스트리트 62
피어스슈바허 마이클
미국 캘리포니아 92013 샌디에고 웨스트 스프루스 스트리트 148

(74) 대리인

김성기

심사청구 : 없음

(54) 형질전환법으로 생성된 데코린

명세서

기술분야

본 출원은 본원에 참고 인용한 가출원 60/201,932(2000년 5월 5일 출원)의 우선권 주장 출원이다.

배경기술

증가하고 있는 다수의 제조업 단백질은 치료적 용도, 진단적 용도, 농업용, 수의용 및 기타 용도로 개발되고 있다; 그러나, 이들 중 다수의 단백질은 종래의 방법을 이용하는 경우 기능적인 형태를 상당량으로 생산하는 것이 어렵거나, 비용이 많이 들 수 있다.

중중, 종래의 방법은 특정 단백질을 생성하는 유전자를 숙주 세포, 예를 들어 박테리아, 효모 또는 포유류 세포 내로 삽입하는 것과 관련되어 있다. 이들 세포는 배양 배지 내에서 성장하며, 목적 단백질은 세포 또는 배양 배지로부터 회수한다. 전통적인 박테리아 또는 효모 시스템은 종종 기능적인 형태의 복잡한 단백질을 생성할 수 없다. 한편, 몇몇 포유류 세포는 복잡한 단백질을 재현할 수 있지만, 이들은 종종 성장시킴이 어려운 뿐만 아니라 비용이 많이 소요되며, 상대적으로 소량의 단백질을 생성하는데 그친다. 또한, 분리되지 않는 단백질은 원래 세포 또는 포유류 세포로부터 정제하기가 상대적으로 어려운데, 그 이유는 이들은 배양 배지내로 분리되지 않기 때문이다.

PG-II 또는 PG-40으로도 알려진 데코린은 섬유아세포에 의해 생성되는 작은 프로테오글리칸이다. 그의 코어 단백질은 분자량이 약 40,000 Da 이다. 코어는 서열이 결정되었으며[참조: Krusius 및 Ruoslahti, Proc. Natl. Acad. USA, 83: 7683 (1986); 본원에 참고 인용함]. 콘드로이틴 설페이트/디만탄 설페이트 형의 단일 글리코사미노글리칸 사슬을 보유하는 것으로 공지되어 있다[참조: E. Ruoslahti, Ann. Rev. Cell Biol., 4: 229-255 (1988); 본원에 참고 인용함]. 데코린의 대부분의 코어 단백질은 약 24개의 아미노산으로 이루어진 투신 중부반 반복부(LPR)의 존재를 특징으로 한다.

프로테오글리칸은 하나 이상의 글리코사미노글리칸 사슬을 보유하는 단백질이다. 공지된 프로테오글리칸은 매우 다양한 기능을 수행하며, 여러 가지 세포 부위에서 확인된다. 다수의 프로테오글리칸은 세포의 매트릭스의 성분이며, 이들은 매트릭스의 어셈블리에 참여하며, 매트릭스에 대한 세포의 부착을 수행한다.

데코린은 TGFβ-유도된 세포 증식 및 외세포성 매트릭스 생성을 방지하기 위해 사용되어 왔다. 따라서, 데코린은 TGFβ-조절된 활성에 의해 유발된 병적 상태, 예를 들어 암, 사구체신염 및 과량의 매트릭스를 특징으로 하는 병적 상태를 감소 또는 예방하기에 유용하다. 예를 들어, 암에서, 데코린을 사용하여 암세포에 대한 TGFβ-1의 성장 자극 활성을 파괴시킬 수 있다. 또한, 데코린은 외세포성 매트릭스의 단백질이 연부조직 상처 위축을 감소 또는 억제하는데 유용하다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

일반적으로, 본 발명은 형질전환법으로(transgenically) 생성된 데코린 제제, 바람직하게는 인간 데코린 제제에 관한 것이다.

형질전환법으로 생성된 데코린은 형질전환 유기체, 즉 형질전환 식물 또는 동물에서 생성된다. 바람직한 형질전환 동물로는 포유류; 조류; 파충류; 및 양서류를 들 수 있다. 적합한 포유동물로는 반추동물; 유계동물; 가축동물; 육식동물 등을 들 수 있다. 특히 바람직한 동물로는 염소, 양, 낙타, 소, 돼지, 말, 황소, 토끼 및 라마를 들 수 있다. 적합한 조류로는 닭, 거위 및 칠면조를 들 수 있다. 형질전환 단백질이 형질전환 동물의 밀크 내로 분리되는 경우, 상기 동물은 연간 1 ℓ 이상, 더 바람직하게는 10 ℓ 이상 또는 100 ℓ 이상의 밀크를 생산할 수 있어야만 한다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 데코린 제제, 바람직하게는 형질전환 유기체 내에서 제조된 데코린 제제는 형질전환 과정이 아닌 천연원에서 발견되거나 이로부터 분리된 것 또는 세포 배양에서 제조한 방법에 의해 생성된 데코린으로부터 분리된 것과 비교하는 경우, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 글리코실화되어 있다(글리코실화된 제제내의 분자수 또는 제제내에서 분자당

에 대한 당의 총 분포로 표현한 것임). 형질전환법으로 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬이 결합되어 있는 것이 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 테코린 제제는, 형질전환 유기체 내에서 제조되는 경우, 테코린 분자의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 GAG 사슬을 보유한다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 제제에서 GAG 사슬을 보유하는 테코린 분자 대 GAG 사슬을 보유하지 않는 테코린 분자의 비는 약 1:2, 1:3, 2:3, 1:4, 3:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 이다.

바람직한 구체예에서, 형질전환 제제, 바람직하게는 형질전환 동물 내에서 제조된 제제는 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태를 포함하며, 글리코실화된 형태의 일부 또는 모두는 예를 들어 제액(예, 밀크)으로부터 예를 들어 표준 단백질 분리 방법에 의해 제거된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 반추동물, 예를 들어 염소의 유선에서 제조된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 동물, 예를 들어 염소의 밀크 속으로 분비된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 유선 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 특이성 프로모터(예; 밀크 열성 단백질 또는 카제인 프로모터)의 조절하에 제조된다. 밀크 특이성 프로모터는 카제인 프로모터, 베타 락토글로불린 프로모터, 유장 산 단백질 프로모터, 또는 락트알부민 프로모터이다.

바람직한 구체예에서, 테코린은 방광 또는 난 특이성 프로모터의 조절 하에서 제조되며, 테코린은 노 또는 난 내로 분비된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 비형질전환법으로 생성된 테코린 제제와는 평균 분자량, 활성, 클리어런스 시간 또는 단백질분해성 분해에 대한 내성에서 차이를 보인다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 세포 배양물 내에서 발견된 것이나 이로부터 제조함으로써 생성된 테코린으로부터 분리한 것과는 상이하다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 유기체로부터 발견되며, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제의 글리코실화는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 배양된 포유류 세포, 예를 들 CHO, COS 또는 HeLa 세포에서 발견되거나, 이로부터 분리된 테코린의 글리코실화와는 상이하다. 예를 들어, 형질전환법으로 생성된 테코린은 테코린을 암호화하거나, 테코린의 발현을 유도하는 핵산을 삽입한 배양된 포유동물 세포에 의해 제조된 단백질과 상이하다.

바람직한 구체예에서, 테코린 제제의 전기영동적 이동성은, 예를 들어 SDS-PAGE에 의해 측정되는 바와 같이, 자연적으로 발생하는 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 상이하며; 제제의 전기영동적 이동성은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린은 자연 발생하는 인간 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기 다르며; 상기 테코린은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기가 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린의 아미노산 서열은 포유류 또는 영장류, 바람직하게는 인간 테코린의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 mg 이상, 10 mg 이상 또는 100 mg 이상의 테코린을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 g 이상, 10 g 이상 또는 100 g 이상의 테코린을 포함한다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상 또는 500 mg/ml 이상의 테코린을 포함한다.

다른 관점에서, 본 발명은 조직 특이성 프로모터, 예를 들어 형질전환 포유류의 밀크 내에서 단백질을 분비시키는 유선 특이성 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 테코린 단백질 암호 서열을 포함하는 분리된 핵산 분자에 관한 것이다.

바람직한 구제에서, 상기 프로모터는 밀크 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 혈청 단백질 또는 카제인 프로모터이다. 상기 밀크 특이성 프로모터는 카제인 프로모터, 베타 락토글로불린 프로모터, 유장 산 단백질 프로모터, 또는 락트알부민 프로모터이다.

바람직한 구제에서, 상기 프로모터는 방광, 난 특이성 프로모터이며, 태코린은 뇨 또는 난 내로 분비된다.

바람직한 구제에서, 태코린의 아미노산 서열은 포유류 또는 영장류, 바람직하게는 인간 태코린의 아미노산 서열이다.

다른 관점에서, 본 발명은 형질전환 태코린 또는 형질전환 태코린 제제를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은

태코린, 바람직하게는 인간 태코린의 발현을 유도하는 트랜스유전자를 포함하는 형질전환 유기체, 즉 형질전환 동물 또는 식물을 제공하는 단계;

상기 트랜스유전자를 발현시키는 단계; 및

상기 유기체 또는 상기 유기체에 의해 생성된 생성물, 예를 들어 밀크, 종자, 모발, 혈액, 난 또는 뇨로부터 형질전환 방법으로 생성된 태코린 또는 형질전환 방법으로 생성된 태코린 제제를 회수하는 단계를 포함한다.

바람직한 구제에서, 상기 방법은

세포내로 태코린의 발현을 유도하는 핵산을 삽입하는 단계 및 상기 세포를 형질전환 유기체로 성장시키는 단계를 추가로 포함한다.

바람직한 형질전환 동물로는 포유류; 조류; 파충류; 및 양서류를 들 수 있다. 적합한 포유류로는 반추동물; 유제동물; 가축 동물; 및 육산 동물을 들 수 있다. 특히 바람직한 동물로는 염소, 양, 낙타, 소, 돼지, 말, 토끼 및 마우스를 들 수 있다. 적합한 조류로는 닭, 기러기, 및 칠면조를 들 수 있다. 형질전환 단백질이 형질전환 동물의 밀크 내로 분비되는 경우, 상기 형질전환 동물은 1년에 1 l 이상, 더 바람직하게는 10 l 이상, 또는 100 l 이상의 밀크를 생산할 수 있어야 한다.

바람직한 구제에서, 형질전환 방법으로 생성된 태코린 제제, 바람직하게는 형질전환 유기체 내에서 제조된 태코린 제제는 형질전환 과정이 아닌 천연원에서 발견되거나 이로부터 분리된 것 또는 세포 배양에서 재조합 방법에 의해 생성된 태코린으로부터 분리된 것과 비교하는 경우, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 글리코실화되어 있다(글리코실화된 제제내의 분자수 또는 제제내에서 분자량에 대한 당의 총 분포로 표현한 것임). 형질전환 방법으로 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬이 결핍되어 있는 것이 바람직하다. 바람직한 구제에서, 태코린 제제는 태코린 분자의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 GAG 사슬을 보유한다. 다른 바람직한 구제에서, 상기 제제에서 GAG 사슬을 보유하는 태코린 분자 대 GAG 사슬을 보유하지 않는 태코린 분자의 비는 약 1:2, 1:3, 2:3, 1:4, 3:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 이다.

바람직한 구제에서, 형질전환 제제, 바람직하게는 형질전환 동물 내에서 제조된 제제는 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태를 포함하며, 글리코실화된 형태의 일부 또는 모두는 예를 들어 체액(예; 밀크)으로부터 예를 들어 표준 단백질 분리 방법에 의해 제거된다.

바람직한 구제에서, 형질전환 방법으로 생성된 태코린은 형질전환 동물, 예를 들어 반추동물, 예를 들어 염소의 유선에서 제조된다.

바람직한 구제에서, 형질전환 방법으로 생성된 태코린은 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 동물, 예를 들어 염소의 밀크 속으로 분비된다.

바람직한 구제에서, 형질전환 방법으로 생성된 태코린은 유선 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 특이성 프로모터(예; 밀크 혈청 단백질 또는 카제인 프로모터)의 조절하에 제조된다. 밀크 특이성 프로모터는 카제인 프로모터, 베타 락토글로불린 프로모터, 유장 산 단백질 프로모터, 또는 락트알부민 프로모터이다.

바람직한 구제에서, 태코린은 방광 또는 난 특이성 프로모터의 조절 하에서 제조되며, 태코린은 뇨 또는 난 내로 분비된다.

바람직한 구체에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 비형질전환법으로 생성된 테코린 제제와는 평균 분자량, 활성, 플러어런스 시간 또는 단백질분해 성 분해에 대한 내성에서 차이를 보인다.

바람직한 구체에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 세포 배양물 내에서 발견된 것이나 이로부터 제조함으로써 생성된 테코린으로부터 분리한 것과는 상이하다.

바람직한 구체에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 유기체로부터 발현되며, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제의 글리코실화는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 배양된 포유류 세포, 예를 들 CHO, COS 또는 HeLa 세포에서 발견되거나, 이로부터 분리된 테코린의 글리코실화와는 상이하다. 예를 들어, 형질전환법으로 생성된 테코린은 테코린을 암호화하거나, 테코린의 발현을 유도하는 핵산을 삽입한 배양된 포유동물 세포에 의해 제조된 단백질과 상이하다.

바람직한 구체에서, 테코린 제제의 전기영동적 이동성은, 예를 들어 SDS-PAGE에 의해 측정되는 바와 같이, 자연적으로 발생하는 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 상이하며; 제제의 전기영동적 이동성은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 다르다.

바람직한 구체에서, 상기 테코린은 자연 발생하는 인간 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기 다르며; 상기 테코린은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기가 다르다.

바람직한 구체에서, 상기 테코린의 아미노산 서열은 포유류 또는 영장류, 바람직하게는 인간 테코린의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.

바람직한 구체에서, 상기 제제는 1 mg 이상, 10 mg 이상 또는 100 mg 이상의 테코린을 포함한다. 바람직한 구체에서, 상기 제제는 1 g 이상, 10 g 이상 또는 100 g 이상의 테코린을 포함한다.

바람직한 구체에서, 상기 제제는 1 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상 또는 500 mg/ml 이상의 테코린을 포함한다.

바람직한 구체에서, 본 발명은 형질전환 포유류의 밀크 내에 외인성 테코린을 포함하는 형질전환 체제를 제공하는 방법에 관한 것인대, 본 발명의 방법은

형질전환 동물의 배선 내로 테코린 단백질 암호화 서열을 도입하여 프로모터 서열에 작동가능하게 연결하고, 유선 상피 세포 내에서 상기 단백질 암호화 서열을 발현시켜 상기 형질전환 포유류로부터 밀크를 얻고, 상기 포유류의 밀크 내로 테코린을 분비시켜 상기 체제를 얻는 단계를 포함한다.

적합한 포유류로는 반추동물; 유제동물; 가축 동물; 및 육산 동물을 들 수 있다. 특히 바람직한 포유류로는 염소, 양, 타조, 소, 돼지, 말, 황소 및 라마를 들 수 있다. 상기 형질전환 포유류는 1년에 1 ℓ 이상, 더 바람직하게는 10 ℓ 이상, 또는 100 ℓ 이상의 밀크를 생산할 수 있어야 한다.

바람직한 구체에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제, 바람직하게는 형질전환 유기체 내에서 제조된 테코린 제제는 형질전환 과정이 아닌 천연원에서 발견되거나 이로부터 분리된 것 또는 세포 배양에서 재조합 방법에 의해 생성된 테코린으로부터 분리된 것과 비교하는 경우, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 글리코실화되어 있다(글리코실화된 제제내의 분자수 또는 제제내에서 분자량에 대한 당의 총 분포로 표현한 것임). 형질전환법으로 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬이 결핍되어 있는 것이 바람직하다. 바람직한 구체에서, 테코린 제제는 테코린 분자의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 GAG 사슬을 보유한다. 다른 바람직한 구체에서, 상기 제제에서 GAG 사슬을 보유하는 테코린 분자 대 GAG 사슬을 보유하지 않는 테코린 분자의 비는 약 1:2, 1:3, 2:3, 1:4, 3:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 이다.

바람직한 구체에서, 형질전환 제제, 바람직하게는 형질전환 동물 내에서 제조된 제제는 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태를 포함하며, 글리코실화된 형태의 일부 또는 모두는 예를 들어 체액(예; 밀크)으로부터 예를 들어 표준 단백질 분리 방법에 의해 분리된다.

바람직한 구체에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 반추동물, 예를 들어 염소의 유선에서 제조된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 동물, 예를 들어 반수동물, 예를 들어 염소의 밀크 속으로 분비된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 유선 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 특이성 프로모터(예; 밀크 혈청 단백질 또는 카제인 프로모터)의 조절하에 제조된다. 밀크 특이성 프로모터는 카제인 프로모터, 베타 락토 글로블린 프로모터, 유강 산 단백질 프로모터, 또는 락트알부민 프로모터이다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 비형질전환법으로 생성된 테코린 제제와는 평균 분자량, 활성, 클리어런스 시간 또는 단백질분해성 분해에 대한 내성에서 차이를 보인다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 세포 배양물 내에서 발견된 것이나 이로부터 재조합법으로 생성된 테코린으로부터 분리한 것과는 상이하다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 유기체로부터 발현되며, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제의 글리코실화는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 배양된 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포에서 발현되거나, 이로부터 분리된 테코린의 글리코실화와는 상이하다. 예를 들어, 형질전환법으로 생성된 테코린은 테코린을 암호화하거나, 테코린의 발현을 유도하는 핵산을 삽입한 배양된 포유동물 세포에 의해 제조된 단백질과 상이하다.

바람직한 구체예에서, 테코린 제제의 전기영동적 이동성은, 예를 들어 SDS-PAGE에 의해 측정되는 바와 같이, 자연적으로 발생하는 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 상이하며; 제제의 전기영동적 이동성은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린은 자연 발생하는 인간 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기 다르며; 상기 테코린은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기가 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린의 아미노산 서열은 포유류 또는 영장류, 바람직하게는 인간 테코린의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 상기 밀크는 1 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상, 500 mg/ml 이상, 1000 mg/ml 이상 또는 2000 mg/ml 이상, 테코린을 포함한다.

다른 관점에서, 본 발명은 형질전환 테코린, 바람직하게는 인간 테코린을 발현하고, 이로부터 형질전환 테코린 제제를 얻을 수 있는 형질전환 유기체에 관한 것이다.

상기 형질전환 유기체는 형질전환 동물 또는 식물이다. 바람직한 형질전환 동물로는 포유류; 조류; 파충류; 및 양서류를 들 수 있다. 적합한 포유류로는 반수동물; 유체동물; 가축동물; 및 육산동물을 들 수 있다. 특히 바람직한 동물로는 염소, 양, 낙타, 소, 돼지, 말, 토끼 및 마우스를 들 수 있다. 적합한 조류로는 치킨, 거위 및 칠면조를 들 수 있다. 상기 형질전환 단백질이 형질전환 동물의 밀크 내로 분비되는 경우, 상기 동물은 연간 1 ℓ 이상, 더 바람직하게는 10 ℓ 이상 또는 100 ℓ 이상의 밀크를 생산할 수 있어야 한다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제, 바람직하게는 형질전환 유기체 내에서 제조된 테코린 제제는 형질전환 과정이 아닌 천연원에서 발견되거나 이로부터 분리된 것 또는 세포 배양에서 재조합 방법에 의해 생성된 테코린으로부터 분리된 것과 비교하는 경우, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 글리코실화되어 있다(글리코실화된 제제내의 분자수 또는 제제내에서 분자량에 대한 당의 총 분포로 표현한 것임). 형질전환법으로 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬이 결핍되어 있는 것이 바람직하다. 바람직한 구체예에서, 테코린 제제는, 형질전환 유기체 내에서 제조되는 경우, 테코린 분자의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 GAG 사슬을 보유한다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 제제에서 GAG 사슬을 보유하는 테코린 분자 대 GAG 사슬을 보유하지 않는 테코린 분자의 비는 약 1:2, 1:3, 2:3, 1:4, 3:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 이다.

바람직한 구체예에서, 형질전환 제제, 바람직하게는 형질전환 동물 내에서 제조된 제제는 글리코실화된 형태 및 비글리코실화된 형태를 포함하며, 글리코실화된 형태의 일부 또는 모두는 예를 들어 제액(예; 밀크)으로부터 예를 들어 표준 단백질 분리 방법에 의해 제거된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 반수동물, 예를 들어 염소의 유선에

서 제조된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 동물, 예를 들어 형질전환 동물, 예를 들어 반수동물, 예를 들어 염소의 밀크 속으로 분비된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 유신 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 특이성 프로모터(예; 밀크 혈청 단백질 또는 카제인 프로모터)의 조절하에 제조된다. 밀크 특이성 프로모터는 카제인 프로모터, 베타 락토글로불린 프로모터, 유장 산 단백질 프로모터, 또는 락트알부민 프로모터이다.

바람직한 구체예에서, 테코린은 방광 또는 난 특이성 프로모터의 조절 하에서 제조되며, 테코린은 노 또는 난 내로 분비된다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 비형질전환법으로 생성된 테코린 제제와는 평균 분자량, 활성, 클리어런스 시간 또는 단백질분해성 분해에 대한 내성에서 차이를 보인다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제는 세포 배양물 내에서 발견된 것이나 이로부터 재조합법으로 생성된 테코린으로부터 분리한 것과는 상이하다.

바람직한 구체예에서, 형질전환법으로 생성된 테코린은 형질전환 유기체로부터 발견되며, 형질전환법으로 생성된 테코린 제제의 글리코실화는 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 배양된 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포에서 발견되거나, 이로부터 분리된 테코린의 글리코실화와는 상이하다. 예를 들어, 형질전환법으로 생성된 테코린은 테코린을 암호화하거나, 테코린의 발현을 유도하는 핵산을 삽입한 배양된 포유동물 세포에 의해 제조된 단백질과 상이하다.

바람직한 구체예에서, 테코린 제제의 전기영동적 이동성은, 예를 들어 SDS-PAGE에 의해 측정되는 바와 같이, 자연적으로 발생하는 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 상이하며; 제제의 전기영동적 이동성은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 인간 테코린의 전기영동적 이동성과는 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린은 자연 발생하는 인간 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기 다르며; 상기 테코린은 포유류 세포, 예를 들어 CHO, COS 또는 HeLa 세포, 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아 또는 효모, 또는 곤충 세포 내에서 재조합적으로 생성된 테코린과 하나 이상의 아미노산 잔기가 다르다.

바람직한 구체예에서, 상기 테코린의 아미노산 서열은 포유류 또는 영장류, 바람직하게는 인간 테코린의 아미노산 서열인 것이 바람직하다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 mg 이상, 10 mg 이상 또는 100 mg 이상의 테코린을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 g 이상, 10 g 이상 또는 100 g 이상의 테코린을 포함한다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 1 mg/ml 이상, 10 mg/ml 이상, 100 mg/ml 이상 또는 500 mg/ml 이상의 테코린을 포함한다.

다른 관점에서, 본 발명은 치료 유효량의 형질전환 테코린 또는 형질전환 테코린 제제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

형질전환 테코린 또는 테코린 제제는 예를 들어, 임의의 방법 또는 본원에 기술한 유기체로부터 제조할 수 있다.

형질전환 테코린 또는 테코린 제제는 본원에 기술한 임의의 것일 수 있다.

다른 관점에서, 본 발명은 형질전환법으로 생성된 테코린 제제, 바람직하게는 인간 테코린 및 1종 이상의 다른 성분, 예를 들어 테코린 이외의 영양 성분을 포함하는 제제에 관한 것이다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 고형 제제 또는 액상 제제일 수 있다.

바람직한 구체예에서, 상기 제제는 액상 담체를 추가로 포함할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 상기 영양 성분은 단백질, 예를 들어 밀크 단백질; 비타민, 예를 들어 비타민 A, 비타민 B, 비타민 D; 탄수화물; 미네랄, 예를 들어 칼슘, 인, 철이다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 예를 들어, 임의의 방법 또는 본원에 기술한 유기체에 의해 제조할 수 있다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 예를 들어 본원에 기술한 임의의 것일 수 있다.

다른 관점에서, 본 발명은 형질전환법으로 생성된 데코린 또는 형질전환 데코린 제제, 바람직하게는 인간 데코린 및 1 종 이상의 데코린 이외의 영양 성분을 포함하는 기능성 식품에 관한 것이다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 임의의 방법 또는 본원에 기술한 유기체에 의해 제조할 수 있다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 예를 들어 본원에 기술한 임의의 것일 수 있다.

다른 관점에서, 본 발명은 데코린이 필요한 개체에게 데코린을 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 형질 전환법으로 생성된 데코린 또는 형질전환 데코린 제제를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

바람직한 구체예에서, 상기 개체는 사람, 예를 들어 데코린이 필요한 환자이다. 예를 들어, 본 발명은 환부에 형질전환 데코린을 투여하여 반흔 형성을 예방하는 방법에 관한 것이다. 피부 반흔은 여러가지 피부 상해를 동반하는 과정으로 콜라겐, 피브로넥틴 및 프로테오글리칸을 포함하는 섬유 조직의 과잉 축적이 기인한 것이다. 섬유질 매트릭스 축적의 유도는 환부에서 혈소판 및 염증 세포에 의한 환부에서의 성장 인자 방출에 기인한 것이다. 주 성장 인자는 섬유질 반흔 조직의 침착을 성장 인자- β 로의 전환으로 유도하는 것으로 생각된다. 데코린은 TGF- β 에 결합하여 외세포성 매트릭스의 유도를 포함하는 TGF- β 의 여러가지 생물학적 기능을 중화시킨다. 이러한 섬유질 외세포성 매트릭스의 탄성 특성의 결핍으로 인해, 심각한 피부 상해로 인한 반흔 조직은 종종 필수적인 조직의 기능을 방해하며, 보이지않는 반흔으로 귀착될 수 있다.

본 발명의 방법에서 형질전환 데코린을 이용하는 것임은, 데코린이 보통의 인간 단백질이며, 천연 TGF- β 조절 경로에 관여하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서, 형질전환 데코린은 화상 흉터, 기타 침입성 피부 상해 및 성형 수술 또는 재생 수술로 인한 피부 반흔을 예방 또는 감소하는데 사용할 수 있다.

데코린-처리된 환부는 데코린으로 처리하지 않은 대조용 환부에 비해 필수적으로 검출가능한 반흔을 확인할 수 없다. TGF- β 유도된 반흔 생성 과정은 성인 및 3기 트리메스터의 태아에게 필수적으로 독특한 것으로 확인되었으나, 1기 2번의 트리메스터의 태아에게는 필요적으로 없는 것으로 확인되었다. 태아 환부에서 반흔의 부재는 환부 층내 TGF- β 의 부재와 관련이 있다. 대조적으로, 성인 조직의 환부 층은 TGF- β 가 두껍게 침착되어 있으며, 완전히 치유된 환부는 과도하게 섬유질인 콜 라겐성 매트릭스를 함유하는 적색의 구화된 반흔으로 대체된다. 데코린 처리한 환부는 조직학적으로 정상이며, 1기 2번의 트리메스터의 태아 환부와 유사하다.

다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 유용하며 형질전환 데코린 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예로는 하이알루론산 및 수용액, 예를 들어 중탄산 완충액, 인산염 완충액, 링거 용액 및 5% 데스트로즈 또는 인간 혈청 알부민(필요한 경우)이 보존된 생리적 염수를 들 수 있다. 또한, 약학 조성물은 담당자에게 공지된, 환부 치유를 촉진시키는 기타 제제를 포함할 수 있다. 이러한 제제로는 예를 들어 생물학적으로 활성인 화학물질 및 폴리펩티드, 예를 들어 1990년 6월 28일에 공개된 WO 90/06767호(본원에 참고 인용함)에 기술된 바와 같은 생분해가능한 중합체에 부착된 RGD-함유 폴리펩티드를 들 수 있다. 이러한 폴리펩티드는 담당에게 공지된 임의의 방법, 예를 들어 공유 결합 또는 이온 결합에 의해 중합체에 결합시킬 수 있다.

다른 관점에서, 본 발명은 개체에서 환부 수축을 감소 또는 억제시키는 방법에 관한 것인데, 이 방법은 형질전환 데코린을 포함하는 약학 조성물을 상기 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 형질전환 데코린을 포함하는 약학 조성물의 투여를 포함하는 환부 수축을 감소시키거나 억제시키는 방법을 제공한다.

다른 관점에서, 본 발명은 개체의 암, 예를 들어 유방암을 치료하는 방법에 관한 것인데, 이 방법은 치료 유효량의 형질전환 데코린을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 임의의 방법 또는 본원에 기술한 유기체에 의해 제조할 수 있다.

형질전환 데코린 또는 데코린 제제는 예를 들어 본원에 기술한 임의의 것일 수 있다.

본원에 기술한 임의의 조성물 및 방법에서, 형질전환 데코린 제제 또는 배합물은 글리코사미노글리칸(GAG) 사슬을 보유하고 있지 않아 매우 균질한 데코린 제제일 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 형질전환 제제 또는 배합물은 상기 데코린 분자의 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만인 GAG 사슬을 보유한다. 다른 바람직한 구체예에서, 형질전환 데코린 제제 또는 배합물은 GAG 사슬을 보유하는 데코린 제제 대 GAG 사슬을 보유하지 않는 데코린 분자의 비가 약 1:2, 1:3, 2:3, 1:4, 3:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9이다.

및/또는 항질전란 단백질의 발현은 항질전란 동물 또는 그의 자손의 대사 또는 건강에 원하지 않는 효과를 발생시킬 수 있다.

따라서, 다른 관점에서, 본 발명은 항질전란 동물 내에서 항질전란 단백질을 생성하는 방법(이때, 항질전란 단백질은 항질전란 동물의 대사에 영향을 미치는 것임)에 관한 것인데, 이 방법은

항질전란 단백질, 예를 들어 항질전란 동물의 밀크 내에 항질전란 단백질을 발현시키는 단계; 및

항질전란 동물을 처리하여 항질전란 동물에 대한 항질전란 단백질의 효과를 억제시키는 단계를 포함한다.

예를 들어, 상기 동물에 대한 항질전란 테코린의 효과를 억제하는 물질, 예를 들어 항질전란 테코린의 활성을 억제하는 물질을 상기 동물에게 투여하거나, 상기 동물은 상기 물질을 항질전란 방법으로 발현시킬 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 물질은 폴리펩티드이다. 상기 물질은, 예를 들어 효소 또는 수용체, 이의 단편, 또는 항질전란 테코린과 상호작용하거나 결합하는 기타 분자이다. 이는 테코린의 분포 또는 수송을 변경시킴으로써 항질전란 테코린의 활성을 경쟁적 억제 또는 비경쟁적 억제하는 방식으로 작용할 수 있다.

항질전란 단백질이 항질전란 동물의 특정 부위, 예를 들어 조직, 체액 또는 장기에서 발견되는 경우, 상기 물질은 그 부위에 투여하거나, 그 부위에서 발견될 수 있다. 예를 들어, 항질전란 동물의 밀크 내에서 발견되는 항질전란 단백질의 경우, 상기 물질은 항질전란 동물의 밀크에 투여하거나, 상기 밀크 내에서 발견될 수 있다.

상기 물질이 항질전란 방법으로 발현되는 경우, 항질전란 테코린 및 상기 물질은 동일한 유형의 프로모터로부터 발현될 수 있는데, 예를 들어 이들은 둘 다 유방 특이성 프로모터, 예를 들어 밀크 특이성 프로모터로부터 발현될 수 있다. 상기 항질전란 테코린 및 상기 물질은 상기 두 물질을 동일하게 발현시키는 프로모터로부터 발현될 수 있거나, 상기 두 물질은 상이한 강도의 상이한 프로모터로부터 발현될 수 있다. 이는 하나 또는 다른 하나가 더 많이 발현되거나 더 적게 발현될 수 있다. 몇몇 경우, 물을 기준하거나 증량을 기준하여 항질전란 테코린의 발현을 초 과하는 것이 바람직할 것이다. 다른 경우, 반대 상황이 상기 물질의 생성을 최적화할 것이다. 상기 물질은 테코린에 발현되는 것 이외의 부위에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 상기 물질은 항질전란 테코린이 필요하지 않은 위치, 예를 들어 항질전란 단백질이 유출될 것 같은 부위, 예를 들어 혈액에 투여할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 항질전란 테코린은 항질전란 동물의 밀크 내에서 발현되며, 상기 물질은 항질전란 동물의 혈액에 투여하거나 혈액 내에서 발현된다.

바람직한 구체예에서, 항질전란 테코린에 결합하는 항체는 상기 항질전란 동물에 투여하거나 상기 동물에서 발견된다. 바람직한 구체예에서, 상기 항질전란 테코린은 밀크 내에서 발현되며, 상기 항체는 혈액 내에서 발견된다.

상기 물질은 항질전란 동물에서 제2 항질전란 단백질로서 투여되거나 발현된다. 그러나, 항질전란 동물, 예를 들어 대형 항질전란 동물, 예를 들어 항질전란 염소를 생성하기 이전에, 상기 물질의 유사성을 테스트하여야만 한다. 이는 상기 동물, 예를 들어 염소에게 상기 테코린과 상기 물질을 투여, 예를 들어 주입하고, 상기 항질전란 동물의 대사 또는 건강에 대한 상기 테코린의 효과를 모니터링함으로써 수행할 수 있다. 상기 물질의 적합한 효과가 확인되는 경우, 항질전란 동물을 생성할 수 있다. 항질전란 테코린을 발현하는 항질전란 동물을 구성하고, 후보 물질을 상기 동물에게 투여하여 후보 물질이 이중 항질전란 동물을 생성하는데 유용한 것인지, 즉 상기 테코린 및 상기 물질에 대해 항질전란적인 것인지를 평가하는 것이 바람직하다.

또한, 숙주 건강은 조직 특이성 발현, 예를 들어 유선, 바람직하게는 밀크 내에서의 발현에 의해 최적화할 수 있다.

항질전란 테코린의 구조는 치료적 효능 또는 예방적 효능, 또는 안정성(예를 들어, 생체의 저장 기간 및 생체 내에서 단백질 분해성 분해에 대한 내성)의 증강 또는 동물의 건강을 최적화시키기 위한 목적을 위해 변경시킬 수 있다. 이러한 변형된 테코린은, 천연 테코린의 하나 이상의 활성을 보유하도록 디자인하는 경우, 본원에 상세하게 기술한 테코린의 기능적 균등물로 고려된다. 예를 들어, 이렇게 변형된 펩티드는 아미노산 치환, 결실 또는 첨가에 의해 생성할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 항질전란 테코린은 제2 폴리펩티드에 융합하여 항질전란 융합 단백질로 발현될 수 있다. 융합 단백질로서의 발현을 이용하여 동물의 건강, 단백질의 분리 또는 희수를 최적화하거나, 단백질의 생체의 저장 기간을 변경할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 테코린은 제2 폴리펩티드 서열과 함께 융합 단백질로서 발현되는데, 융합으로 인해 항질전란 동물의 대사 또는 건강에 대한 테코린의 원하지 않는 효과를 최소화할 수 있다. 제2 폴리펩티드는 예를 들어, 테코린 부분과 제2 분자, 예를 들어 수용체, 예를 들어 테코린 수용체의 상호작용을 방해함으로써 융합 단백질의 테코린 활성을 변경시킬 수 있다. 제2 단백질은 융합 단백질의 조직 분포를 변경하는 것일 수 있다. 예를 들어, 테코린 부분에 대한 제2 폴리펩티드의 융합은 발현 위치, 예를 들어 유방 조직 또는 밀크로부터 항질전란 동물내의 다른 위치, 예를 들어

어 순환계 또는 혈액으로의 이동 또는 전달을 예방할 수 있다.

바람직한 구체예에서, 융합 단백질이 발현되거나 분리된 후, 테코린 부분으로부터 절단된다.

형질전환 대코린은 제2 폴리펩티드와 함께 융합 단백질로서 발현될 수 있는데, 이는 형질전환 대코린의 분리 또는 회수를 최적화한다. 예를 들어, 상기 제2 폴리펩티드는 소정의 용해 특성을 융합 단백질에 부여하거나, 예를 들어 더 가용성으로 하거나 덜 가용성으로 함으로써, 계제를 단순하게 하는 부분을 공급함으로써, 예를 들어 친화성 부분을 공급함으로써 분리를 최적화할 수 있다.

본원에서 사용한 바와 같이, 두개의 단백질이 다음과 같은 변수중에서 하나 이상 상이한 경우, 상기 두개의 단백질의 글리코실화는 상이하다:

- (1) 단백질에 부착된 당 잔기의 총 분자량;
- (2) 단백질에 부착된 당 잔기의 총 수;
- (3) 부착된 당 잔기의 서브유닛 조성;
- (4) 부착된 당내에 존재하는 분지점의 수;
- (5) 부착된 당내 분지점의 위치;
- (7) 당이 단백질에 부착하는 위치의 수;
- (8) 단백질 내에서 당이 부착하는 위치 또는 위치들;
- (9) O-연결된 글리코실화 위치의 수; 및
- (10) N-연결된 글리코실화 위치의 수.

선택된 특성, 예를 들어 상기한 특성중 한 이상을 보유하는 형질전환 대코린 분자의 비율이 제2 제제에서 그 특성을 보유하는 분자의 비율과 상이한 경우, 두 제제는 서로 상이하다. 예를 들어, 두 제제 각각은 글리코실화된 대코린 및 GAG 사슬이 결결된 대코린을 함유할 수 있다.

본원에 사용된 용어 '제제(preparation)'는 하나 이상의 형질전환 동물에 의해 생성된 다수의 분자의 의미한다. 이는 글리코실화를 상이하게 하는 분자를 포함하거나, 또는 이 관점에서 균질할 수 있다. 본원에 사용된 용어 '형질전환법'으로 생성된 대코린의 실질적으로 균질한 제제는 대코린 분자의 10% 미만, 5% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만이 GAG 사슬을 보유하는 대코린 제제를 의미한다.

본원에 사용된 용어 정제된 제제, 실질적으로 순수한 폴리펩티드 제제 또는 분리된 폴리펩티드는, 형질전환법으로 생성된 폴리펩티드의 경우, 형질전환 동물 내에서 발생한 1종 이상의 다른 단백질, 지질 또는 핵산, 또는 형질전환 동물에 의해 생성된 유제, 예를 들어 밀크, 또는 다른 물질, 예를 들어 난으로부터 분리된 폴리펩티드이다. 상기 폴리펩티드는 이를 정제하는 데 사용하는 물질, 예를 들어 항체 또는 겔 매트릭스, 예를 들어 폴리아크릴아마이드로부터 분리하는 것이 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 정제된 제제의 10, 20, 50, 70, 80 또는 95 건조 중량% 이상을 구성하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 상기 제제는 단백질 서열결정을 가능하게 하는 데 충분한 폴리펩티드; 1, 10 또는 100 μ g 이상의 폴리펩티드; 1, 10 또는 100 mg 이상의 폴리펩티드를 함유한다.

실질적으로 순수한 핵산은 다음중 하나 또는 둘 다인 핵산을 의미한다: 핵산이 유도되는 유기체의 자연 발생하는 계층에서 바로 직접 인접하는(즉, 5' 단부에서 하나 및 3' 단부에서 하나) 서열, 예를 들어 암호 서열의 하나 또는 둘 다가 바로 직접 인접하지 않는 서열; 또는 핵산이 유도되는 유기체에서 발생하는 핵산 서열을 실질적으로 보유하지 않는 서열. 예를 들어, 상기 용어는 벡터, 예를 들어 자가 복제성 플라스미드 또는 바이러스 내로 혼입된 재조합 DNA, 원핵세포 또는 진핵세포의 게놈 DNA 내로 혼입된 재조합 DNA 또는 다른 DNA 서열과는 독립적인 별개의 분자(예를 들어, PCR 또는 제한 엔도뉴클레아제 처리에 의해 생성된 cDNA 또는 게놈 DNA 단편)로서 존재하는 재조합 DNA를 포함한다. 또한, 실질적으로 순수한 DNA는 추가의 대코린 서열을 암호화하는 하이브리드 유전자의 일부분인 재조합 DNA를 포함한다.

본원에 사용된 용어 펩티드, 단백질, 및 폴리펩티드는 상호 대체해서 사용할 수 있는 용어들이다.

본원에 사용한 용어 '상동성' 또는 '서열 동일성'은 2개의 폴리펩티드 분자간 또는 2개의 핵산 분자간의 서열 유사성을 의미한다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열의 상응하는 위치에서와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유되어 있는 경우, 상기 분자들은 그 위치에서 상동성이다(즉, 본원에 기술한 바와 같이, 아미노산 또는 핵산 '상동성'은 아미노산 또는 핵산 '동일성'과 동일하다). 두 서열 사이의 상동성(%)은 서열에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수이다(즉, %상동성 = (동일한 위치의 수/위치의 총수) x 100).

예를 들어, 두 서열에서 10개의 위치중 6개의 위치가 매칭되거나, 상동성인 경우, 두 서열은 60% 상동성이거나 60% 서열 동일성이다. 예를 들어, DNA 서열 ATGGCC 및 TATGCC는 50% 상동성 또는 서열 동일성을 공유한다. 일반적으로, 두 서열이 정렬되어 있을때 비교하여 최대 상동성 또는 서열 동일성을 산출한다.

두 서열간의 서열의 비교 및 상동성(%)의 측정은 수학적 알고리즘을 이용하여 수행할 수 있다. 서열 비교를 위해 사용되는 수학적 알고리즘의 바람직한 비제한적인 예는 문헌[참조: Karlin 및 Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-77 (1993)]에 기술된 바와 같이, 변형된 Karlin 및 Altschul의 알고리즘이다[참조: Karlin 및 Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68 (1990)]. 이러한 알고리즘은 Altschul등의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(2.0 버전)에 들어있다[참조: Altschul 등, J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990)]. BLAST 서치는 NBLAST 프로그램을 이용하여 스코어 = 100, 단어길이 = 12로 수행하여 본 발명의 ITALY 핵산 분자에 대한 뉴클레오타이드 서열 상동성을 구했다. BLAST 단백질 서치는 NBLAST 프로그램을 이용하여 스코어 = 50, 단어길이 = 3으로 수행하여 본 발명의 ITALY 핵산 분자에 대한 뉴클레오타이드 서열 상동성을 구했다. 비교를 목적으로 정렬된 정렬을 얻기 위해, 정렬된 BLAST를 문헌[참조: Altschul 등, Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402 (1997)]에 기술된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 정렬된 BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각 프로그램(예를 들어, BLAST 및 정렬된 BLAST 프로그램)에서 디폴트 변수를 이용할 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>를 참조할것. 서열 비교에 이용하는 수학적 알고리즘의 비제한적인 다른 바람직한 예는 Myers 및 Miller, CABIOS(1989)의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지인 ALIGN 프로그램(2.0 버전)에 들어있다. 아미노산 서열 비교를 위해 ALIGN 프로그램을 이용하는 경우, PAM120 웨이트 잔기 테이블, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용할 수 있다.

본 명세서에 사용한 용어 '트랜스유전자는 그것이 도입되는 형질전환 동물 또는 세포에 대해 부분적으로 또는 전체적으로 이종성인, 또는 그것이 도입되는 형질전환 동물 또는 세포의 내인성 유전자에 대해 이종성인, 그것이 삽입된 세포의 게놈을 변경시키는 방식으로 동물의 개능 내로 삽입될 수 있거나, 삽입되도록 디자인된 즉 외래인 핵산 서열(예를 들어, 1종 이상의 테코린 폴리펩티드를 암호화하는 서열)을 의미한다(예를 들어, 트랜스유전자는 천연 유전자의 위치와는 상이한 위치에 삽입되거나 그의 삽입은 녹아웃을 유발한다). 트랜스유전자는 하나 이상의 전사 조절 서열 및/또는 다른 핵산 서열, 예를 들어 인트론을 포함할 수 있는데, 이는 예를 들어 유선 내에서 테코린을 암호화하는 선택된 핵산 서열의 최적 발현 및 분비를 위해 필요할 수 있으며, 모두 선택된 테코린 핵산에 작동가능하게 연결되며, 인핸서 서열을 포함할 수 있다. 테코린 서열은 조직 특이성 프로모터, 예를 들어 유선 특이성 프로모터 서열(이 경우, 단백질은 형질전환 포유류의 밀크내에 분비됨), 노 특이성 프로모터 또는 난 특이성 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

본원에 사용한 용어 '형질전환 세포'는 트랜스유전자를 함유하는 세포를 의미한다.

본원에 사용한 용어 '형질전환 유기체'는 형질전환 동물 또는 식물을 의미한다.

본원에 사용한 용어 '형질전환 동물'은 동물의 세포의 하나 이상, 바람직하게는 모두가 인간의 개입에 의해, 예를 들어 당업계에 공지된 형질전환 기법에 의해 도입된 비인간 동물이다. 트랜스유전자는 사료값은 유전자 조작에 의해, 예를 들어 미량유입 또는 재조합 바이러스를 이용하는 감염에 의해 세포의 전구물질로 도입에 의해 직접적으로 세포 내에 도입할 수 있다.

본원에서 포유류는 유선을 보유하고, 밀크를 생산할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 의미한다.

본원에 사용한 용어 '축산 동물'은 밀크 생산 동물을 의미한다. 바람직한 구체에서, 축산 동물은 다량의 밀크를 생산하며, 수유 기간이 긴 동물, 예를 들어 소나 염소를 의미한다.

본원에 사용한 용어 '식물'은 전체 식물, 식물 부분, 식물 세포 또는 식물 세포군을 의미한다. 본 발명의 방법에 사용할 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 형질전환 기법을 수행할 수 있는 넓은 부류의 고등 식물, 예를 들어 외떡잎 식물과 쌍떡잎 식물을 포함한다. 식물에는 여러가지 배수체의 식물, 배수체, 2배체 및 반수체를 포함한다.

본원에 사용한 용어 '약학적으로 허용가능한 조성물'은 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 담체(들)와 함께 배합된 치료 효료물의 형질전환 테코린을 포함하는 조성물을 의미한다.

본원에 사용한 용어 '배합물'은 형질전환 테코린을 포함하는 고체 조성물, 예를 들어 분말 또는 액체 조성물을 의미한다

다. 배합물은 치료적 잇점 또는 영양적 잇점을 제공할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 배합물은 테코린 이외에 1종 이상의 영양 성분을 포함할 수 있다. 이들 배합물은 보존제를 함유하여 미생물의 성장을 예방할 수도 있다.

본원에 사용된 용어 '기능성 식품'은 형질전환 테코린을 함유하는 식품 또는 식품의 부분을 의미한다. 기능성 식품은 의학적 또는 건강상의 잇점을 제공할 수 있으며, 이는 질병의 예방, 치료 또는 치유가 포함된다. 형질전환 단백질은 종종 기능성 식품 내에 1 mg/kg 이상의 농도로 존재한다. 기능성 식품은 형질전환 동물의 밀크를 포함할 수 있다.

본원에 사용된 용어 '테코린'은 프로테오글리칸 또는 테코린의 하나 이상의 생물학적 활성을 보유하는 이의 단편 또는 유사체를 의미한다. 폴리펩티드가 하기 하는 특성중 하나를 보유한다면, 테코린의 생물학적 활성을 보유하는 것이다: 1) 외세포성 매트릭스 성분, 예를 들어 피브로넥틴(예를 들어, 세포 결합 도메인 및/또는 피브로넥틴의 헤파린 결합 도메인), 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 I, II, VI, XIV)과 상호작용함, 예를 들어 결합함; 2) 소원섬유 생성을 조절함, 예를 들어 억제함; 3) 트롬보스폰딘과 상호작용함, 예를 들어 결합함; 4) 상피 성장 인자 수용체와 상호작용함, 예를 들어 결합함; 5) 상피 성장 인자 수용체를 조절함, 예를 들어 활성화함; 6) 신호전달 경로를 조절함, 예를 들어 촉진하거나 억제함; 7) 상피 성장 인자 수용체를 조절함, 예를 들어 억제함; 8) 세포 증식을 조절함, 예를 들어 억제함; 9) 세포 이동을 조절함, 예를 들어 억제함; 10) 세포 부착을 조절함; 11) 매트릭스 결합을 촉진함. [참조: Krusius 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7683 (1986)]에 기술된 아미노산 서열을 보유하는 테코린 또는 이의 변이체를 의미한다. 자연발생 하는 인간 테코린은 세린 잔기, 예를 들어 문헌[참조: Krusius 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7683 (1986)]에 기술된 아미노산 서열중 4번 세린 잔기에 단일 GAG 사슬을 보유한다. 또한, 자연발생적인 인간 테코린은 2개 내지 3개의 아스파라긴 결합된 올리고사카라이드를 포함할 수 있다 [참조: 예를 들어, Glossi, J. Biol. Chem. 259: 14144-14150 (1984)].

본원에 사용된 용어 '개체(subject)'는 인간 및 비인간 동물을 포함하는 의미이다. 바람직한 구체예에서, 개체는 사람, 예를 들어 테코린이 필요한 환자, 예를 들어 비이상적인 TGF- β 활성화와 관련된 질병, 예를 들어 암, 당뇨병성 신장 질환 또는 침입성 피부 상해, 예를 들어 화상 또는 성형 수술 또는 재생 수술을 받은 환자, 또는 연결조직 장애, 뼈 상실 또는 비정상적인 뼈 성장과 관련된 질환(예를 들어, 불완전 골생성, 골관절염)을 앓고 있는 사람이다. 본원에 사용된 용어 '비인간 동물'은 모든 척추동물, 예를 들어 포유류 및 비포유류, 예를 들어 비인간 영장류, 반추동물, 조류, 양서류, 파충류를 의미한다. 형질전환 동물의 밀크 내에서 제조된 단백질을 상업적으로 생산하는 데 대한 형질전환 기법의 기술은 단백질 생성의 전통적인 방법에 비해 상당한 잇점을 제공한다. 이들 잇점으로는 요구되는 총 기술의 감소, 생산 비용을 개발 라이프 사이클에서 초기에 설비를 구축하기 위한 필요 자본의 제거 및 복잡한 단백질에서 유닛당 직접 생산 비용의 절감을 들 수 있다. 특정한 복잡한 단백질에서 중요한 잇점은 형질전환법에 의한 생성이 단지 기술적으로 경제적으로 실현할 수 있는 상업적인 생산 방법일 수 있다는 것이다.

본원에 사용된 용어 '환부(상치) 수축'은 환부가 치유되는 과정에서 한 단계 를 의미하는데, 환부의 가장자리가 함께 환부를 폐쇄하려는 시도를 의미한다 [참조: 예를 들어, Grinnell, J. Cell Biol. 124: 401-404 (1994)]. 본원에 사용된 용어 '환부 치유'는 가장 광범위한 의미로 사용되어 환부(상치)가 생겼을 때부터 환부 치유와 관련된 생리적인 특성이 관찰될 때까지의 전체적인 과정을 의미한다. 예를 들어 환부 수축은 환부 치유 과정의 일부뿐이다. 따라서, 환부 수축을 감소 또는 억제하는 조성물은 환부 치유를 증강시킬 수 있다. 환부 치유는 필요적으로 상처가 생기기 이전에 존재하였던 것과 동일한 수준의 조직화를 획득하는 상처난 조직으로 귀착되지 않는다.

인간은 글리코실화된 테코린 및 하나 이상의 GAG 사슬이 결합된 테코린 둘 다를 생성한다. GAG 사슬이 결합된 테코린이 생물학적으로 활성이 있다. 형질전환 유기체, 예를 들어 동물은 GAG 사슬이 결합된 테코린의 바람직한 공급원인데, 이로부터 더 균질한 테코린 체제를 제조할 수 있다.

본 발명의 다른 특정 및 잇점은 후술하는 발명의 상세한 설명 및 특허청구의 범위로부터 명백해질 것이다.

상세한 설명

형질전환 포유류

이하, 비인간 형질전환 동물을 생성하는 상세한 방법을 '실시예' 부분에서 기술한다.

이러한 방법은 포유류의 배선로 DNA 구성물을 도입하여 형질전환 포유류를 제조하는 것과 관련되어 있다. 예를 들어, 상기 구성물의 하나 또는 수개의 사본은 표준 형질전환 기법에 의해 포유류 배아의 계통 내로 혼입될 수 있다.

소 및 염소가 바람직함에도 불구하고, 다른 비인간 포유류를 사용할 수도 있다. 바람직한 비인간 포유류는 반추동물, 예를 들어 소, 양, 낙타 또는 염소이다. 바람직한 비인간 동물의 추가 예로는 말, 돼지, 토끼, 마우스 및 래트를 들 수 있다. 핵 이식법에서, 세포, 예를 들어 유전자 조작된 세포의 공급원으로 사용된 포유류는 획득하려는 포유류에 따라

달라질 것이다. 한 예로, 소의 계놈은 소 난모세포를 이용하는 핵 이식에 사용되어야만 한다.

여러가지 형질전환 동물의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 형질전환 염소를 생성하는 프로토콜은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 트랜스유전자는 예를 들어 문헌[참조: Ebert 등, *Bio/Technology* 12: 699 (1994)]에 기술된 바와 같은 미량주입 또는 WO 98/30683에 기술된 바와 같은 핵 이식법에 의해 염소의 배선내로 도입할 수 있다. 형질전환 돼지의 생성을 위한 프로토콜은 문헌[참조: White 및 Yannoutsos, *Current Topics in Complement Research*: 번역학 64차 포럼, pp. 88-94]; 미국 특허 제5,523,226호; 미국 특허 제5,573,933호; WO 93/25071호; 및 WO 95/04744호에서 확인할 수 있다. 형질전환 래트의 생성을 위한 프로토콜은 문헌[참조: Bader 및 Ganten, *Clinical and Experimental Pharmacology, Supp.* 3: S81-S87 (1996)]에 기술되어 있다. 형질전환 소의 제조를 위한 프로토콜은 미국 특허 제5,741,957호, WO 98/30683호 및 문헌[참조: *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994, Carl A. Pinkert, 아카데미 출판사]에서 확인할 수 있다. 형질전환 양의 생성을 위한 프로토콜은 WO 97/07669호 및 문헌[참조: *Transgenic Animal Technology, A Handbook*, 1994 Carl A. Pinkert, 아카데미 출판사]에서 확인할 수 있다.

형질감염된 세포주

핵 이식에 의한 형질전환 동물의 생성을 위해 유전자 조작된 세포는 소정의 핵산, 예를 들어 단백질을 암호화하는 핵산이 도입된 세포주로부터 얻을 수 있다.

구성물은 통상적인 형질전환 기법 또는 형질감염 기법을 통해 세포내로 도입할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 '형질감염' 또는 '형질전환(transformation)'은 형질전환 시열을 숙주 세포내로 도입하기 위한 여러가지 기법, 예를 들어 칼슘 포스페이트 또는 칼슘 클로라이드 공침, DEAE-덱스트란-매개된 형질감염, 리포펙션, 또는 전기천공법을 포함하는 의미이다. 또한, 생물학적 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터는 다음과 같이 사용할 수 있다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염하기 위해 적합한 방법은 문헌[참조: Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2판), Cold Spring Harbor Laboratory, 뉴욕 콜드 스프링 하버 콜드 스프링 하버 래버러토리 출판, (1989)] 및 기타 적합한 실험실 매뉴얼에서 확인할 수 있다.

2가지 유용한 방법은 전기천공법과 리포펙션이다. 각각에 대한 개략적인 설명을 후술한다.

DNA 구성물은 다음 프로토콜에 따른 전기천공법에 의해 공여체 세포주, 예를 들어 배아세포, 예를 들어 배아 체세포주 내로 안전하게 투입할 수 있다: 세포는 약 4×10^6 세포/ml로 재현탁한다. 세포 현탁액 0.5 ml에 선형 DNA 50 μ g를 첨가하고, 상기 현탁액은 0.4 cm 전극 클립(바이오라드)에 위치시킨다. 전기천공은 바이오라드 진 펄스 전기천공기를 이용하고, 25 mA에서 330 볼트, 1000 mF 및 무한 저항의 조건 하에서 수행한다. DNA 구성물이 선택을 위해 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 경우, 네오마이신 내성 클론을 선택하고, G418(지브코 BRL) 350 μ g/ml와 함께 15일 동안 항응고처리한다.

DNA 구성물은 다음과 같은 프로토콜을 이용하여 리포펙션에 의해 공여체 세포 내로 안전하게 도입할 수 있다: 약 2×10^5 세포는 3.5 cm 웰 내에 플레이트팅하고, 리포펙트아민(상표명, 지브코 BRL)을 이용하여 선형화된 DNA 2 μ g로 형질감염한다. 형질감염하고 48시간이 경과한 후, 세포는 1:1000 및 1:5000으로 나누었으며, DNA 구성물이 선택을 위한 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 경우, G418을 0.35 mg/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 네오마이신 내성 클론을 분리하고, 냉동보존 및 핵 이식을 위해 팽창시켰다.

단백질의 조직-특이성 발현

형질전환 동물의 특정 조직 또는 유체, 예를 들어 밀크, 혈액 또는 뇨에서 단백질, 예를 들어 이중 단백질을 발현시키는 것이 바람직하다. 이중 단백질이 발현되는 조직 또는 유체로부터 이중 단백질을 회수할 수 있다. 이하, 밀크 특이성 프로모터의 조절 하에서 이중 단백질을 생성하는 방법을 기술한다. 또한, 다른 조직 특이성 프로모터 뿐만 아니라 다른 조절 요소, 예를 들어 신호 서열 및 비분비된 단백질의 분비를 증강시키는 서열도 기술한다.

밀크 특이성 프로모터

유용한 전사 프로모터는 유방 상피 세포에서 우선적으로 활성화되는 프로모터들인데, 그 예로는 밀크 단백질, 예를 들어 카제인, 베타 락토글로불린[참조: Clark 등, *Bio/Technology* 7: 487-492 (1989)], 유장 산 단백질[참조: Gordan 등, *Bio/Technology* 5: 1183-1187 (1987)] 및 락트알부민[참조: Soulier 등, *FEBS Letts.* 297: 13 (1992)]을 암호화하는 유전자를 조절하는 프로모터를 들 수 있다. 카제인 프로모터는 임의의 포유류 종의 알파, 베타, 감마 또는 카파 카제인 유전자로부터 유래할 수 있으며; 바람직한 프로모터는 염소 베타 카제인 유전자로부터 유래한 것이다[참조: DiTullio, *Bio/Technology* 10: 74-77 (1992)]. 밀크 특이성 단백질 프로모터 또는 유방 조직에서 특이적으로 활성화되는 프로모터들은 cDNA 또는 계놈 서열로부터 유래할 수 있다. 이들은 원래 계놈 서열인 것이 바람직하다.

DNA 서열 정보는 적어도 하나의 유기체 및 종종 몇몇 유기체에서 상기 목록화한 유전 특이성 유전자에서 얻을 수 있다[참조: 예를 들어, Richards 등, J. Biol. Chem. 256, 526-532 (1981)(α -락토알부민 래트); Campbell 등, Nucleic Acids Res. 12, 8685-8697 (1984)(래트 WAP); Jones 등, J. Biol. Chem. 260, 7042-7050 (1985)(래트 β -카제인); Yu-Lee amp; Rosen, J. Biol. Chem. 258, 10794-10804 (1983)(래트 γ -카제인); Hall, Biochem. J. 242, 73-742(1987)(α -락토알부민 인간); Stewart, Nucleic Acids Res. 12, 389 (1984)(소 α s1 및 κ 카제인 cDNA); Go rodetsky 등, Gene 66, 87-96 (1988)(소 β 카제인); Alexander 등, Eur. J. Biochem. 178, 395-401 (1988)(소 κ 카제인); Brignon 등, FEBS Lett. 188, 48-55 (1977)(소 α S2 카제인); Jamieson 등, Gene 61, 85-90 (1987), Iva nov 등, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369, 425-429 (1988), Alexander 등, Nucleic Acids Res. 17, 6739 (1989)(소 β 락토글로불린); Vilotte 등, Biochimie 69, 609-620 (1987)(소 α -락토알부민)]. 여러가지 밀크 단백질 유전자의 구조 및 기능은 본원에 참고 인용한 문헌[참조: Mercier amp; Vilotte, J. Dairy Sci. 76, 3079-3098 (1993)]에 기술되어 있다. 추가의 인접 서열이 이중 단백질의 발현 최적화에 유용한 경우, 이러한 서열은 프로브로서 기존의 서열을 이용하여 클로닝할 수 있다. 상이한 유기체로부터 유래한 유전 특이성 조절 서열은 공지된 같은 기원의 뉴클레오타이드 서열 또는 프로브로서 같은 기원의 단백질에 대한 항체를 이용하여 이러한 유기체로부터 라이브리리를 스크리닝함으로써 얻을 수 있다.

신호 서열

유용한 신호 서열은 진핵세포 단백질 또는 원핵세포 단백질의 분비를 유발하는 밀크 특이성 신호 서열 또는 기타 신호 서열이다. 바람직하게는, 신호 서열은 밀크 특이성 신호 서열로부터 선택되는데, 즉 밀크 내로 분비된 생성물을 암호화하는 유전자로부터 유래한 것이다. 가장 바람직한 것은 밀크 특이성 신호 서열이 구성물에 사용된 밀크 특이성 프로토타와 관련되어 있는 것인데, 이에 대해서는 후술하도록 한다. 신호 서열의 크기는 결정적인 사항은 아니다. 필요한 모든 것은 상기 서열이 예를 들어 유방 조직 내에서 소정의 제조할 단백질의 분비를 수행하기에 충분한 것이라는 것이다. 예를 들어, 카제인, 예를 들어 알파, 베타, 감마 또는 카파 카제인, 베타 락토글로불린, 유장 산 단백질 및 락트알부민을 암호화하는 유전자로부터 유래한 신호 서열을 사용할 수 있다. 바람직한 신호 서열은 염소 베타-카제인 신호 서열이다.

다른 분비된 단백질, 예를 들어 신장 세포, 해당 세포 또는 간 세포에 의해 분비된 단백질로부터 유래한 신호 서열을 사용할 수도 있다. 신호 서열은 예를 들어 뇨 또는 혈액 내로 단백질을 분비시키는 것이 바람직하다.

기타 조직 특이성 프로모터

특정 조직에서의 발현을 제공하는 기타 조직 특이성 프로모터를 사용할 수 있다. 조직 특이성 프로모터는 다른 특정 조직에서 더 강하게 발현되는 프로모터이다. 종종 조직 특이성 프로모터는 특정 조직 내에서 필요적으로 과도하게 발현된다. 예를 들어, 변경된 단백질이 간에서 정상적으로 발현되는 경우, 간 특이성 프로모터가 사용될 수 있다. 이는 역제체 tRNA가 사용되어 혈청 알부민을 변경시키는 경우일 것이다. 이 상황에서, 역제체 tRNA를 암호화하는 형질전환 서열은 간 특이성 프로모터의 조절 하에 있을 수 있다.

사용할 수 있는 조직 특이성 프로모터의 예로는 신장 특이성 프로모터, 예를 들어 네스틴, Wnt-1, Pax-1, 인그레일드-1, 인그레일드-2, 소닉 헤지호그; 간 특이성 프로모터, 예를 들어 알부민, 알파-1 안티트립신; 근육 특이성 프로모터, 예를 들어 미오게닌, 액틴, 미오D, 미오시; 난포세포 특이성 프로모터, 예를 들어 ZP1, ZP2, ZP3; 고환 특이성 프로모터, 예를 들어 프로타딘, 페르틸린, 시나프로테말 복합 단백질-1; 혈액 특이성 프로모터, 예를 들어 글로불린, GAT A-1, 포르포빌리노겐 디아미나제; 폐 특이성 프로모터, 예를 들어 계면활성 단백질 C; 피부 특이성 프로모터 또는 울 특이성 프로모터, 예를 들어 케라틴, 엘라스틴; 내피 특이성 프로모터, 예를 들어 Tie-1, Tie-2; 및 뼈 특이성 프로모터, 예를 들어 BMP를 들 수 있다.

또한, 여러 조직에서의 발현을 위해 일반적인 프로모터도 사용할 수 있다. 일반적인 프로모터의 예로는 β -액틴, ROS A-21, PGK, FOS, c-myc, Jun-A 및 Jun-B를 들 수 있다.

인슐레이터 서열

형질전환 동물을 제조하기 위해 사용한 DNA 구성물은 하나 이상의 인슐레이터 서열을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 '인슐레이터', '인슐레이터 서열' 및 '인슐레이터 요소'는 본원에서 상호 교체하여 사용할 수 있는 용어들이다. 인슐레이터 요소는 유전자 발현을 음성적으로 또는 양성적으로 교란하지 않는, 그의 작용 범위 내에 위치한 유전자의 전사를 격리시키는 조절 요소이다. 인슐레이터 서열은 전사하려는 DNA 서열의 어느 한쪽 측면에 삽입되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 인슐레이터는 프로모터로부터 5' 쪽으로 약 200 bp 내지 약 1 kb 및 소정의 유전자의 3' 단부에서 프로모터로부터 약 1 kb 내지 5 kb 이상에 위치할 수 있다. 프로모터 및 소정의 유전자의 3' 단부로부터 인슐레이터 서열의 거리는 당업자가 측정할 수 있으며, 이는 소정 유전자의 상대적인 크기, 프로모터 및 구성물에 사용된 인센스에 따라 달라진다. 또한, 하나 이상의 인슐레이터 서열은 프로모터로부터 5' 또는 트랜스유전자로부터 3'에 위치할 수

있다. 예를 들어, 2개 이상의 인슐레이터 서열은 프로모터로부터 5'에 위치할 수 있다. 트랜스유전자의 3' 단부에 위치하는 인슐레이터 또는 인슐레이터들은 소정의 유전자의 3' 단부에 위치하거나, 3' 조절 서열의 3' 단부, 예를 들어 3' 미해독 영역(UTR) 또는 3' 인접 서열에 위치할 수 있다.

바람직한 인슐레이터는 본원에 참고 인용한 PCT 공보 94/23046에 기술된 바와 같이, 닭 β -글로빈 좌의 5' 단부를 포함하며, 닭 5' 구성적 초감응 부위에 상응하는 DNA 결편이다.

DNA 구성물

이중 단백질을 암호화하는 카세트는 프로모터, 예를 들어 특정 조직, 예를 들어 유방 상피 세포를 위한 프로모터, 예를 들어 카제인 프로모터, 예를 들어 염소 카제인 프로모터, 밀크 특이성 신호 서열, 예를 들어 카제인 신호 서열, 예를 들어 베타-카제인 신호 서열 및 이중 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 구성물로 조합할 수 있다.

또한, 상기 구성물은 비분비된 단백질을 암호화하는 DNA 서열의 3' 하류의 미해독 영역을 포함할 수 있다. 이러한 영역은 발현 시스템의 RNA 전사체를 안정화시킬 수 있으며, 따라서 발현 시스템으로부터 목적 단백질의 수율을 증가시킬 수 있다. 3' 미해독 영역 중에서 본 발명의 사용을 위한 구성물에 유용한 것은 폴리 A 신호를 제공하는 서열이다. 이러한 서열은 예를 들어 SV40 작은 t 항원, 카제인 3' 미해독 영역 또는 당업계 잘 알려져 있는 기타 3' 미해독 서열로부터 유래할 수 있다. 3' 미해독 영역의 길이는 결정적인 사항은 아니나, 폴리 A 전사체에 대한 안정적 효과는 발현 서열의 RNA를 안정화시키는 데 중요한 것으로 생각된다.

필요에 따라, 상기 구성물은 프로모터 및 신호 서열을 암호화하는 DNA 서열 사이에 5' 미해독 영역을 포함할 수 있다. 이러한 미해독 영역은 프로모터가 유래한 동일한 조절 영역으로부터 얻을 수 있거나 상이한 유전자로부터 얻을 수 있는데, 예를 들어 이들은 다른 합성, 반합성 또는 천연 공급원으로부터 유래할 수 있다. 재차 강조하지만, 그들의 특정 길이는 결정적인 사항은 아니나, 이들은 발현의 수준을 개선시키는 유용한 것으로 생각된다.

또한, 상기 구성물은 유방 상피 세포 내에서 우선적으로 발현되는 유전자의 N-말단 암호 영역의 약 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, N-말단 암호 영역은 사용된 프로모터, 예를 들어 염소 β -카제인 N-말단 암호 영역에 상응할 수 있다.

상기 구성물은 당업계에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 상기 구성물은 더 큰 플라스미드의 일부분으로서 제조할 수 있다. 이러한 제제는 효율적인 방식으로 올바른 구성물의 클로닝 및 선택을 가능하게 해준다. 상기 구성물은 플라스미드 상의 편리한 제한 위치 사이에 존재하여 이들의 목적 포유류세포의 혼입을 위해 전여 플라스미드 서열로부터 용이하게 분리될 수 있도록 한다.

약학 조성물

본 발명의 형질전환법으로 생성된 폴리펩티드 또는 제제는 질병 또는 질환, 예를 들어 암 또는 침입성 피부 상태, 예를 들어 화상을 약학, 예제, 치료 또는 예방하기에 유용한 약학 조성물 내로 혼입시킬 수 있다. 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 형질전환 동물의 밀크 내에 치료적 양 또는 예방적 양의 형질전환법으로 생성된 데오린을 함유하여야 한다.

약학적 담체는 환자에게 상기 폴리펩티드를 전달하기에 적합한 임의의 상용성, 비독성 물질이다. 멸균수, 알콜, 지방, 왁스 및 불활성 고체를 담체로 사용할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 보조제, 완충제, 염산제 등도 약학 조성물 내로 혼입될 수 있다. 약학 조성물내 형질전환법으로 생성된 펩티드 또는 기타 활성제의 농도는 넓은 범위에서 가변적인데, 즉 약 0.1 중량% 미만, 일반적으로 약 1 중량% 이상 내지 20 중량% 이상이다.

경구 투여를 위해, 활성 성분은 고체 제형, 예를 들어 캡슐, 정제 및 분말 또는 액체 제형, 예를 들어 엘릭시르, 시럽 및 현탁액으로 투여할 수 있다. 활성 성분(들)은 불활성 성분 및 분할 담체, 예를 들어 글루코스, 락토스, 수크로즈, 만니톨, 전분, 셀룰로즈 또는 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 나트륨 사카린, 탈립, 마그네슘 카르보네이트 등과 함께 젤라틴 캡슐내로 캡슐화할 수 있다. 목적하는 색, 맛, 안정성, 완충성, 분산 특성 또는 기타 공지된 요구되는 특성을 제공하기 위해 첨가될 수 있는 추가의 비활성 성분의 예로는 적철 산화물, 실리카 겔, 나트륨 라우릴 설페이트, 이산화티탄, 식용 백색 잉크 등을 들 수 있다. 유사한 의외제에 사용하여 압착 정제를 제조할 수도 있다. 정제 및 캡슐 등 다 서방형 제형으로 제조하여 수시간 동안 지속 방출하게 할 수도 있다. 압착 정제는 당으로 코팅하거나 필름으로 코팅하여 임의의 불쾌한 맛을 감추고 대기로부터 정제를 보호하거나, 장용외처리하여 위장관 내에서 선택적인 방출이 이루어지도록 할 수도 있다. 경구 투여용 액체 제형은 착색제 및 방향제를 함유하도록 하여 환자가 보다 각 복용할 수 있도록 할 수도 있다.

코 투여의 경우, 상기 폴리펩티드는 에어리졸로 제형화될 수 있다. 본원에 사용한 용어 '에어리졸'은 본 발명의 화합물

을 인의 가스계 현탁상으로 포함하는 것을 말하는데, 이는 기관지 또는 코를 통해 흡입될 수 있다. 구체적으로, 에어러졸은 본 발명의 화합물 액체의 가스계 현탁액을 포함하는데, 이는 계량 투여 흡입기 또는 분무기 또는 미스트 분무기로 생성될 수 있다. 에어러졸은 공기 또는 예를 들어 흡입 장치들 통해 취입에 의해 전달될 수 있는 기타 담체 가스 내에 현탁된 본 발명의 화합물의 건조 분말 조성물을 포함한다[참조: Jones, Drug Delivery to the Respiratory Tract, Ellis Horwood (1987); Gonda, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 6: 273-313 (1990); 및 Raeburn 등, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 27: 143-159 (1992)].

본 발명의 약학 조성물은 정맥내 또는 경구 투여할 수 있다. 또한, 몇몇 경우에는 피내 투여 또는 근육내 투여도 가능하다. 치료적 용도를 위해, 상기 약학 조성물은 질병 또는 질환으로 고생하는 환자, 예를 들어 암 환자 또는 침입성 피부 상태 환자에게 상기 질병을 억제, 예방 또는 감상시키기에 충분한 양을 투여한다. 이러한 목적을 달성하기 위해 필요한 양은 '치료 유효량 또는 투여량'이라 칭한다.

배합물

배합물은 형질전환법으로 생성된 테코린을 포함한다. 바람직한 구제예에서, 상기 배합물은 형질전환 테코린 및 1종 이상의 테코린 이외의 영양 성분을 포함한다. 영양 성분은 단백질, 예를 들어 밀크 단백질; 비타민, 예를 들어 비타민 A, 비타민 B, 비타민 D; 탄수화물; 미네랄, 예를 들어 칼슘, 인, 철일 수 있다. 상기 배합물은 고체 또는 액체 형태일 수 있다. 바람직한 구제예에서, 상기 배합물은 액상 담체, 예를 들어 희석제, 예를 들어 물을 추가로 포함한다.

바람직한 구제예에서, 이들 배합물은 환자에게 경구 투여, 국소 투여 또는 정맥내 투여 또는 근육내 투여하기에 적합할 수 있다. 배합물은 치료적 용도 및/또는 영양적 용도로 유용하다.

기능성 식품

형질전환 테코린은 기능성 식품 내에 포함될 수 있다. 상기 식품은 형질전환 포유류로부터 얻은 밀크 또는 밀크 제품, 또는 본 발명의 형질전환 단백질을 발현하는 형질전환 식물로부터 얻은 식물 부분이다. 기타 기능성 식품의 예로는 본 발명의 형질전환 단백질이 혼입되어 있는 디저트, 아이스크림, 푸딩 및 젤리 뿐만 아니라 스프 및 음료들 들 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 분리된 형질전환 단백질은 공지된 기타 첨가제, 담체, 충전제 및 희석제와 함께 또는 단독으로 분말 형태 또는 정제 형태로 제공될 수 있다. 기능성 식품은 문헌[참조: Scotty Heegenhart, Food Product Design (1993. 12)]에 기재되어 있다.

형질전환 식물

형질전환 유기체는 DNA 트랜스유전자가 핵 또는 색소체 계층내로 삽입된 형질전환 식물일 수 있다. 상기 식물 형질전환은 당업계에 공지되어 있다[참조: 일반적으로, Methods in Enzymology Vol. 153('Recombinant DNA Part D') 1987, Wu 및 Grossman Eds., 아카데미 출판 및 유럽 특허 출원 EP 693554호].

외래 핵산은 마이크로피펫을 이용하여 식물 세포내로 직접 미량주입함으로써 기계적으로 전달할 수 있다. 외래 핵산은 세포에 의해 흡수되는 유전 물질과 침전 복합체를 형성하는 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 식물 세포내로 전달할 수 있다[참조: Paszkowski 등, EMBO J. 3: 2712-22 (1984)].

외래 핵산은 전기천공법에 의해 식물 세포 내로 도입할 수 있다[참조: Fromm 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824 (1985)]. 이 기법에서, 식물 원형질체는 관련 유전자 구성물을 함유하는 플라스미드 또는 핵산의 존재 하에서 전기천공시킨다. 높은 전계 강도에서의 전기적 충격은 플라스미드의 도입을 가능하게 하는 생물막을 가역적으로 투과 가능하게 만들어 준다. 전기천공된 식물 원형질체는 세포벽을 재생하며, 분열하며, 식물 캘러스를 형성한다. 형질전환된 유전자를 보유한 형질전환된 식물 세포의 선택은 표준형 마커를 이용하여 수행할 수 있다.

또한, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV)는 식물 세포 내로 외래 핵산을 도입하기 위한 벡터로 사용할 수 있다[참조: Hohn 등, 'Molecular Biology of Plant Tumors', 뉴욕, 아카데미 출판사, pp. 549-560 (1982); Howell, 미국 특허 제4,407,956호]. CaMV 바이러스 DNA 계층은 모 박테리아 플라스미드 내로 삽입되어 박테리아 내에서 증식할 수 있는 재조합 DNA 분자를 생성한다. 클로닝용, 재조합 플라스미드는 다시 클로닝하고, 목적 DNA 서열을 덩크의 독특한 제한 위치 내로 도입하여 추가로 변경시킬 수 있다. 이어서, 재조합 플라스미드의 변형된 바이러스 부분은 모 박테리아 플라스미드로부터 절제해내고, 식물 세포 또는 식물들을 접종하는데 사용한다.

외래 유전자를 식물 세포 내로 도입하는 다른 방법은 작은 미드 또는 입자의 매트릭스내 또는 표면 상에 핵산을 보유한 작은 입자를 고속 투과시켜 투과시키는 방법이다[참조: Klein 등, Nature 327: 70-73 (1987)]. 전형적으로 새로운 핵산 절편의 일회성 도입만이 필요한 경우에도, 특히 이 방법은 다수의 도입을 제공한다.

식물 세포 내로 핵산을 도입하는 바람직한 방법은 식물 세포, 외식편, 분열조직 또는 종자를 상기 핵산으로 형질전환된 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 감염시키는 것이다. 당업계에 공지된 적합한 조건 하에서, 형질전환된 식물 세포는 성장하여 싹뿌리, 뿌리를 형성하고, 아나가 식물로 자라난다. 상기 핵산은 예를 들어, 아그로박테리움 투메파시엔스의 Ti 플라스미드에 의해 적합한 식물 세포 내로 도입할 수 있다. 상기 Ti 플라스미드는 아그로박테리움 투메파시엔스에 의한 감염시 식물 세포에 전달되며, 식물 계통 내로 안정하게 통합된다[참조: H. orsch 등, 'Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants', Science 233: 496-498 (1984); Fraley 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983)].

Ti 플라스미드는 형질전환된 세포의 생성을 위해 필수적인 2개의 영역을 함유한다. 전이 DNA(T DNA)라 칭하는 이들 중 한 영역은 종양 형성을 유도한다. 독성 영역이라 칭하는 다른 영역은 식물 계통 내로 전달되어 그의 전달 능력에 영향을 받지 않고 외래 핵산 서열의 삽입에 의해 크기가 증가할 수 있다. 종양 유발 유전자를 제거하여 이들이 더 이상 방해하지 않도록 함으로써 변경된 Ti 플라스미드는 적합한 식물 세포 내로 본 발명의 유전자 구성물을 전달하기 위한 벡터로서 사용할 수 있다.

현재, 아그로박테리움으로 식물 세포를 형질전환시키는 3가지 이상의 상이한 방법이 있다: (1) 배양된 분리된 원형질체와 아그로박테리움의 동시배양; (2) 아그로박테리움을 이용하는 세포 또는 조직의 형질전환; 또는 (3) 아그로박테리움을 이용하는 종자, 나뭇잎 정점 또는 분열조직의 형질전환. 첫번째 방법은 원형질체를 배양하고, 배양된 원형질체로부터 식물 재생을 가능하게 하는 확립된 배양 시스템이 필요하다. 두번째 방법은 식물 세포 또는 조직이 아그로박테리움에 의해 형질전환될 수 있고, 형질전환된 세포 또는 조직이 완전한 식물로 재생되도록 유도할 수 있어야 한다. 세번째 방법은 미세번식이 필요하다.

이인 시스템에서, 감염되기 위해서는 2개의 플라스미드가 필요하다: T-DNA 함유 플라스미드와 vir 플라스미드. 다수의 T-DNA 함유 플라스미드 중 임의의 하나를 사용할 수 있으며, 유일한 필요조건은 2개의 플라스미드 각각에 대해 독립적으로 선택할 수 있어야 한다는 것이다.

식물 세포 또는 식물의 형질전환후, Ti 플라스미드에 의해 형질전환되어 DNA 단편이 통합된 이들 식물 세포 또는 식물들은 적합한 표현형 마커를 이용하여 선택할 수 있다. 이들 표현형 마커로는 항생제 내성, 제초제 내성 또는 시각적인 관찰을 들 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 다른 표현형 마커는 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에 사용할 수 있다.

원형질체를 분리하고, 완전히 재생된 식물로 배양할 수 있는 식물들은 형질전환하여 외래 유전자가 전이된 완전한 식물들을 회수할 수 있다. 적합한 몇몇 식물로는 프라가리아속, 로터스속, 메디카고속, 오노브리키스속, 트리폴리움속, 트리코넬라속, 비그나속, 사이트루스속, 리넬속, 게라니움속, 메니앳속, 다우커스속, 아라비도시스속, 브래시카속, 라파나속, 시나피스속, 애트로파속, 램시킴속, 하이오사이아무스속, 라이코페트시몬속, 니코티아나속, 솔라넬속, 패튜니아속, 디기탈리스속, 마조라나속, 사이오호리움속, 헬리안투스속, 락투카속, 브로무스속, 아스파라거스속, 안디르히눔속, 헤레로칼리스속, 네메이아속, 필라곤디움속, 페니킴속, 페니세툼속, 라넬리스속, 새시시오속, 살피그로시스, 쿠쿠미스속, 브로말리아속, 글리신속, 물리움속, 제아속, 트리티쿰속, 소르그움속 및 다우라속을 중을 들 수 있다.

다수의 식물들은 배양된 세포 또는 조직으로부터 재생될 수 있다. 본원에 사용된 용어 '재생'은 식물 세포, 일군의 식물 세포, 식물 부분 또는 식물편(예를 들어, 원형질체, 캘러스 또는 조직 일부)로부터 전체의 식물을 생성시키는 것을 의미한다[참조: Methods in Enzymology, Vol. 153(Recombinant DNA Part D) 1987, Wu 및 Grossman Eds., 아카데미 출판, 또한 Methods in Enzymology, Vol. 118; 및 Klee 등, Annual Review of Plant Physiology, 38: 467-486 (1987)].

배양 원형질체로부터 식물 재생은 문헌[참조: Evans 등, 'Protoplasts Isolation and Culture', Handbook of Plant Cell Cultures 1: 124-176(뉴욕, 맥밀란 출판 1983); M. R. Davey, 'Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplast', Protoplast(1983)-Lecture Proceedings, pp. 12-29, (Birkhauser, Basel 1983); P. J. Dale, 'Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops', Protoplast(1983)-Lecture Proceedings, pp. 31-41, (Birkhauser, Basel 1983); 및 H. Binding, 'Regeneration of Plants', Plant Protoplast, pp. 21-73(보카라톤의 CRC 출판, 1985).

원형질체로부터의 재생은 식물 종마다 다르지만, 일반적으로 외인성 서열의 사본을 함유하는 형질전환된 원형질체의 원형질체를 먼저 생성한다. 특정 종에서, 프로토플라스트 현탁액으로부터 배아 형성이 유도되며, 천연적인 배아로서 속성되고 발아하는 단계가 이어진다. 배양 배지는 여러가지 아미노산 및 호르몬, 예를 들어 옥신과 시토키닌을 함유할 수 있다. 또한, 글루탐산이나 프롤린을 배지에 첨가하는 것이 유익하다. 구체적으로 옥수수 알과 같은 종에서 유익한 효과가 관찰된다. 싹뿌리 및 뿌리는 통상 동시에 발생한다. 효율적인 재생은 배지, 유전형 및 배양의 이력에 따라 달라진다. 이들 세가지 변수를 조절하면, 재생은 완전히 재현가능하며, 반복가능하다.

생장력있게 증식된 곡물에서, 성숙한 형질전환 식물은 절지하거나 조직 배양 기법에 의해 번식하여 시험, 예를 들어 생장 특성을 위한 테스트를 위해 동일한 다수의 식물을 생성한다. 바람직한 형질전환 식물을 선택하고, 이렇게 새로운 변종을 얻고, 상업적으로 판매하기 위해 생장력있게 증식시킨다. 종자 증식된 곡물에서, 성숙한 형질전환 식물은 자가 교배하여 동형접합의 동종번식 식물을 생성한다. 동종번식 식물은 새로이 도입된 외래 유전자 활성 레벨을 위한 유전자를 함유하는 종자를 생성한다. 이들 종자는 선택된 표현형을 보유하는 식물을 생성하도록 성장시킬 수 있다. 본 발명에 따른 동종번식 식물을 이용하여 새로운 하이브리드를 발생시킬 수 있다. 이 방법에서, 선택된 동종번식 계통은 다른 동종번식 계통과 교배하여 하이브리드를 생성한다.

재생된 식물로부터 얻은 부분, 예를 들어 꽃, 종자, 잎, 가지, 열매 등은 본 발명에 포함되나, 이들 부분은 그렇게 형질전환된 세포를 포함하여야 한다. 재생된 식물의 후대 및 변종, 및 돌연변이도 본 발명에 포함되나, 이들 부분은 도입된 DNA 서열을 포함하여야 한다. 또한, 재생된 식물의 후대 및 변종, 및 돌연변이도 본 발명의 범위에도 포함된다.

그러나, 계승 통합 과정에 도움이 되거나, 형질전환된 이들 세포 또는 식물을 용이하게 선택하는 수단을 제공하는, 도입하려는 핵산 단편의 본래에 대한 내용을 부여하는 임의의 추가 부작된 벡터는 유익하며, 이용할 수 있는 형질전환 식물 또는 식물 세포를 선택하는데 따른 어려움을 크게 감소시킨다.

형질전환 식물 또는 식물 세포의 선택은 전형적으로 시각적인 분석, 예를 들어 색 변화(예를 들어, 백색 꽃, 가변 색소 생성 및 꽃의 균일한 색 패턴 또는 불규칙 패턴)의 관찰에 기초하나, 또한 효소 활성 또는 생장을 정량화하는 생화학적 분석을 이용할 수도 있다. 형질전환 식물 또는 식물 세포는 소정의 식물 부분을 보유하는 식물로 성장하며, 유전자 발현은, 예를 들어 시각적인 관찰(플라보노이드 유전자에 대해) 또는 생화학적 분석(노닌 분해); 페스틴 불활; 효소 분석 및 플라보노이드 화합물 분석, 예를 들어 분광광도법으로 모니터링한다[참조: Harborne 등, *The Flavonoids*, Vol. 1 및 2, 아카데미 출판, 1975]. 적합한 식물을 선택하고 추가로 평가할 수 있다. 유전자 조작된 식물을 생성하는 방법은 미국 특허 제5,283,184호, 제5,482,852호 및 유럽 특허 출원 EP 693 554호에 추가 기술되어 있다.

밀크로부터의 정제

형질전환 단백질은 상대적으로 높은 농도와 많은 부피로 우유 내에서 생성할 수 있으며, 재생할 수 있는 원료로부터 용이하게 수확할 수 있는 정상적으로 프로세싱된 펩티드를 많은 양으로 연속 제공할 수 있다. 밀크로부터 단백질을 분리하기 위한 몇몇 상이한 방법이 업계에 공지되어 있다.

일반적으로 밀크 단백질은 여러 방법들을 조합하여 분리한다. 먼저, 생 밀크분별하여 지방을 제거하는데, 예를 들어 스키밍, 원심분리, 침강(H.E. Swaisgood, *Developments in Dairy Chemistry, I: Chemistry of Milk Protein*, Applied Science Publishers, NY 1982), 산 침전(미국 특허 제4,644,056호) 또는 레닌 또는 키모트립신을 이용한 효소적 용고(Swaisgood, 동일 문헌)를 이용하여 제거한다. 다음, 주 밀크 단백질은 투명한 용액 또는 큰 부피의 침전으로 분별하고, 이로부터 소정의 특정 단백질을 용이하게 정제할 수 있다.

프랑스 특허 제2487642호는 탈지 밀크 또는 유장으로부터 배제 크로마토그래피 또는 이온 교환 크로마토그래피와 막 한외여과를 병용하여 밀크 단백질을 분리하는 것에 대해 기술하고 있다. 먼저 유장은 레닌 또는 락토산을 이용하는 용고에 의해 카제인을 제거하여 생성한다. 미국 특허 제4,485,040호는 2개의 순차적인 한외여과 단계에 의해 유장으로부터 부식유무내의 알파-락토글로불린 농후 생성물의 분리를 기술한다. 미국 특허 제4,644,056호는 pH 4.0-5.5에서 산 침전고, 세공 크기가 0.1 내지 1.2 μm 인 막 상에서 순차적인 교차 흐름 여과하여 생성된 물을 정화하고, 이어서 분리 한계가 5 내지 80 kDa인 막 상에서 농축하여 밀크 또는 초유로부터 면역글로불린을 정제하는 방법을 기술하고 있다.

유사하게, 미국 특허 제4,897,465호는 열형, 난향 또는 유장으로부터 pH 이동을 병용하는 금속 산화물 막 상에서의 순차적인 한외여과에 의해 면역글로불린과 같은 단백질을 농축 및 농후하는 방법을 교시하고 있다. 여과는 선택된 단백질의 등전점(pI) 이하의 pH에서 수행하며, 단백질 부식유로부터 큰 부피의 오염물을 제거하고, 이어서 선택된 단백질의 pI 보다 큰 pH에서 여과하여 불순물을 유지시키고, 선택된 단백질을 통과시킨다. 상이한 여과 농도법은 유원 특허 EP 467 482 B1에 기술되어 있는데, 탈지된 스키밍 밀크는 밀크 단백질의 pI 이하인 pH 3-4로 감소시켜 카제인과 5-20% 고체를 함유하는 부식유를 형성한다. 또는, 영국 특허 출원 제2179947호에는 한외여과로 샘플을 농축하고, 이어서 거의 중성 pH에서 약한 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 유장으로부터 락토페린을 분리하는 방법을 기술하고 있다. 측정된 순도는 보고된 바 있다. WO 95/22258호는, 락토페린과 같은 단백질은 농축액의 침가, 이어서 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 높은 이온 세기로 조정된 밀크로부터 회수한다.

이들 모든 방법에서, 먼저 밀크 또는 이의 분획을 처리하여 지방, 지질 및 여과 막 또는 크로마토그래피 매체를 오염시키는 기타 특정 물질을 제거한다. 이렇게 생성된 초기 분획은 카제인, 유장 또는 전유 단백질로 구성될 수 있으며, 이후 이로부터 소정의 단백질을 분리한다.

WO 94/19935는 전유로부터 양으로 하전된 제제, 예를 들어 아르기닌, 이미다졸 또는 비스-트리스를 이용하여 전유 단백질의 용해도를 안정화시킴으로써 생물학적 활성 단백질을 분리하는 방법을 개시하고 있다. 이러한 처리는 세정된 액을 형성하는데, 이로부터 예를 들어, 막을 통해 여과하여 여과되지 않았던 침전된 단백질에 의해 옹고되는 단백질을 분리할 수 있다.

미국 출원 08/648,235호는 전유 또는 밀크 분획으로부터 점성 흐름 여과에 의해 생물학적으로 활성인 형태로 펩티드와 같은 가용성 밀크 성분을 분리하는 방법을 기술하고 있다. 이전의 분리 방법들과는 달리, 이 방법은 전유를 먼저 분별하여 지방 및 카제인 미셀을 제거할 필요가 없어 공정이 단순해지며, 회수율의 감소 및 생활상의 상실이라는 문제점도 피할 수 있다. 이 방법은 추가의 정제 단계와 병용하여 오염물을 추가로 제거하고, 소량의 성분을 정제할 수 있다.

데코린의 서열

본원에 사용된 용어 '데코린'은 프로테오글리칸 또는 데코린의 하나 이상의 생물학적 활성을 보유하는 이의 단편 또는 유사체를 의미한다. 폴리펩티드가 하기 하는 특성중 하나를 보유한다면, 데코린의 생물학적 활성을 보유하는 것이다: 1) 외세포성 매트릭스 성분, 예를 들어 피브로넥틴(예를 들어, 세포 결합 도메인 및/또는 피브로넥틴의 해파린 결합 도메인), 클라겐(예를 들어, 클라겐 I, II, VI, XIV)과 상호작용함, 예를 들어 결합함; 2) 소인성유 생성을 조절함, 예를 들어 억제함; 3) 트롬보스폰딘과 상호작용함, 예를 들어 결합함; 4) 상피 성장 인자 수용체와 상호작용함, 예를 들어 결합함; 5) 상피 성장 인자 수용체를 조절함, 예를 들어 활성화함; 6) 신호전달 경로를 조절함, 예를 들어 촉진하거나 억제함, 예를 들어 키나제 억제제, 예를 들어 시클린의존성 키나제 억제제 p21에 유도하기 위한 경로를 촉진함; 7) 성장 인자, 예를 들어 TGF- β 와 상호작용함, 예를 들어 결합함; 8) 세포 증식을 조절함, 예를 들어 억제함; 9) 세포 이동을 조절함, 예를 들어 억제함; 10) 세포 부착을 조절함; 11) 매트릭스 어셈블리 및 조직화를 조절함.

데코린을 암호화하는 서열은 공지되어 있다. 바람직하게는, 인간 데코린은 문헌[참조: Krusius 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7683 (1986)]에 기술된 아미노산 서열을 보유하는 데코린 또는 이의 변이체를 의미한다. 자연발생하는 인간 데코린은 세린 잔기, 예를 들어 문헌[참조: Krusius 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7683 (1986)]에 기술된 아미노산 서열중 4번 세린 잔기에 단일 GAG 사슬을 보유한다. 또한, 자연발생적인 인간 데코린은 2개 내지 3개의 아스파라긴 결합된 올리고사카라이드를 포함할 수 있다[참조: 예를 들어, Glossl, J. Biol. Chem. 259: 14144-14150 (1984)].

데코린의 단편과 유사체

형질전환법으로 생성된 데코린은 자연발생하는 단백질의 아미노산 서열을 보유할 수 있거나, 이는 자연발생하는 단백질의 단편 또는 유사체일 수 있다.

바람직한 구체에서, 데코린 폴리펩티드는 아미노산 서열에서 1, 2, 3, 5, 또는 10개 이하의 잔기가 자연발생하는 데코린의 서열과 상이하다. 다른 바람직한 구체에서, 데코린 폴리펩티드는 아미노산 서열에서 잔기의 1, 2, 3, 5, 또는 10% 이하가 자연발생하는 데코린의 서열과 상이하다. 바람직한 구체에서, 상기 잔기는 데코린 폴리펩티드가 데코린의 생물학적 활성을 나타낼 만큼의 것이다. 다른 바람직한 구체에서, 상기 잔기는 데코린 폴리펩티드가 데코린의 생물학적 활성을 보유하지 않을 만큼의 것이다. 바람직한 구체에서, 상기 잔이의 하나 이상 또는 모두는 보존적인 아미노산 변화이다. 다른 바람직한 구체에서, 상기 변화의 하나 이상 또는 모두는 보존적 아미노산 변화 이외의 변화이다.

바람직한 구체에서, 상기 데코린 폴리펩티드는 전장 데코린 폴리펩티드의 단편, 예를 들어 자연발생하는 데코린 폴리펩티드의 단편이다.

바람직한 구체에서, 상기 단편은 길이가 5 이상, 10 이상, 20 이상, 50 이상, 100 이상 또는 150 이상의 아미노산이며; 상기 단편은 길이가 200 미만, 150 미만, 100 미만, 50 이하인 아미노산 잔기이며; 상기 단편은 자연발생하는 데코린의 생물학적 활성을 나타낼 만큼의 것이다; 상기 단편은 자연발생하는 데코린의 생물학적 활성의 작동물질 또는 길항 물질이며; 상기 단편은 수용체 또는 효소에 대한 데코린의 결합을 억제하는, 예를 들어 경쟁적으로 또는 비경쟁적으로 억제할 수 있다.

바람직한 구체에서, 상기 단편은 자연발생하는 데코린의 상응하는 아미노산 서열과 60% 이상, 더 바람직하게는 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 이상의 서열 동일성을 나타낸다.

바람직한 구체에서, 상기 단편은 척추동물, 예를 들어 포유류, 예를 들어 영장류, 예를 들어 인간 데코린 폴리펩티드의 단편이다.

바람직한 구체예에서, 상기 단편은 아미노산 서열에서 1, 2, 3, 5, 또는 10개 이하의 잔기가 자연발생하는 데코린의 상응하는 잔기와 상이하다. 다른 바람직한 구체예에서, 데코린 폴리펩티드는 아미노산 서열에서 잔기의 1, 2, 3, 5, 또는 10% 이하가 자연발생하는 데코린의 서열과 상이하다. 바람직한 구체예에서, 상기 차이는 데코린 폴리펩티드가 데코린의 생물학적 활성을 나타낼 만큼의 것이다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 차이는 데코린 폴리펩티드가 데코린의 생물학적 활성을 보유하지 않을 만큼의 것이다. 바람직한 구체예에서, 상기 차이의 하나 이상 또는 모두는 보존적인 아미노산 변화이다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 변화의 하나 이상 또는 모두는 보존적 아미노산 변화 이외의 변화이다.

본 발명의 폴리펩티드는 다중 유전자, 대체 전사 이벤트, 대체 RNA 스플라이싱 및 대체 해독 및 해독후 이벤트의 존재로 인해 발생하는 것을 포함한다.

단편 및 유사체의 생성

당일자는 단편 또는 유사체를 생성함으로써 데코린의 개시된 구조를 변경시킬 수 있고, 새롭게 생성된 구조의 활성을 테스트할 수 있다. 이하, 단편 및 유사체를 생성하고 테스트할 수 있는 종래의 방법의 예를 기술한다. 이들 방법 또는 다른 방법을 이용하여 데코린 폴리펩티드의 단편 및 유사체를 제조하고 스크리닝할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 변경된 데코린 구조는 인간 데코린이다.

단편의 생성

단백질의 단편은 여러가지 방법, 예를 들어 재조합적인 방법, 단백질분해성 분해 또는 화학 합성에 의해 생성할 수 있다. 폴리펩티드의 내부 또는 말단 단편은 상기 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 한 단부(말단 단편인 경우) 또는 양 단부(내부 단편인 경우)로부터 한 이상의 뉴클레오타이드를 제거함으로써 생성할 수 있다. 돌연변이 유발법 DNA의 발현은 폴리펩티드 단편을 생성한다. 따라서, '말단-분해(end-nibbling)' 엔도뉴클레아제를 이용하는 분해는 일련의 단편을 암호화하는 DNA를 생성할 수 있다. 또한, 단백질의 단편을 암호화하는 DNA는 랜덤 쉬어링, 제한 분해 또는 상기 방법의 병용에 의해 생성할 수 있다.

또한, 단편은 종래의 메릴레이드 고체 상 F-Moc 또는 t-Boc 화학과 같은 업계 공지의 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩티드는 단편의 중첩없이 소정 길이의 단편으로 임의 분할하거나 또는 소정 길이의 중첩 단편으로 분할할 수 있다.

유사체의 생성: 무작위법에 의한 변경된 DNA 및 펩티드 서열의 생성

단백질의 아미노산 서열 변이체는 단백질 또는 단백질의 특정 도메인 또는 영역을 암호화하는 DNA의 무작위 돌연변이 유발에 의해 제조할 수 있다. 유용한 방법으로는 PCR 돌연변이유발법 및 포화 돌연변이유발법을 들 수 있다. 또한, 무작위 아미노산 서열 변이체의 라이브러리에서 한 세트의 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 서열의 합성에 의해 생성할 수 있다(변이체의 라이브러리에서 단백질을 스크리닝하는 방법은 본원 이외에도 기재되어 있다).

PCR 돌연변이유발법

PCR 돌연변이유발법에서, 감소된 Taq 폴리머라제 적합도를 이용하여 DNA의 클로닝된 단편에 무작위 돌연변이를 도입한다[참조: Leung 등, Technique 1: 11-15 (1989)]. 이는 매우 강력하며, 상대적으로 신속한 무작위 돌연변이 도입 방법이다. 돌연변이유발시키려는 DNA 영역은 예를 들어, dGTP/dATP 비로 5를 사용하고, PCR 반응에 Mn^{2+} 를 첨가함으로써 Taq DNA 폴리머라제에 의한 DNA 합성의 적합도를 감소시키는 조건 하에서 PCR을 이용하여 증폭시킨다. 증폭된 DNA 단편의 풀은 적합한 클로닝 벡터 내로 삽입하여 무작위 돌연변이 라이브러리를 제공한다.

포화 돌연변이유발법

포화 돌연변이유발법은 다수의 단일 염기 치환을 클로닝된 DNA 단편 내로 신속하게 도입하는 방법이다[참조: Maye rs 등, Science 229: 242 (1985)]. 이 방법은 예를 들어 시험관 내에서 일본뇌 DA의 화학적 처리 또는 조사에 의한 돌연변이의 생성 및 상보적 DNA 스트랜드의 합성을 포함한다. 돌연변이 빈도는 처리의 강도를 조절하여 조절할 수 있고, 필요적으로 모든 가능한 염기 치환을 얻을 수 있다. 이 방법은 증성 치환 물 속에서 돌연변이 단편에 대한 유전적 선택을 포함하고 있지 않으며, 기능을 변경시키는 것도 얻을 수 있다. 점 돌연변이의 분포는 보존된 서열 요소를 향해 편향되지 않는다.

축퇴성 올리고뉴클레오타이드

또한, 상동체의 라이브러리는 한 세트의 축적성 올리고뉴클레오타이드 서열로부터 생성할 수 있다. 축적성 서열의 화학 합성은 자동 DNA 합성기로 수행할 수 있으며, 이어서 합성 유전자는 적합한 발현 벡터 내로 연결한다. 축적성 올리고 뉴클레오타이드의 합성은 당입자에 공지되어 있다[참조: 예를 들어, Narang, SA(1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura 등(1981) Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Else vier pp273-289; Itakura 등(1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura 등(1984) Science 198: 1056; Ike 등(1983) Nucleic Acid Res. 11: 477]. 이러한 기법은 다른 단백질의 유도된 진화에 사용되어 왔다[참조: 예를 들어, Sc ott 등(1990) Science 249: 386-390; Roberts 등(1992) PNAS 89: 2429-2433; Devlin 등(1990) Science 249: 4 04-406; Cwirla 등(1990) PNAS 87: 6378-6382; 및 미국 특허 제5,223,409호, 제5,198,346호 및 제5,096,815호]

유사체의 생성: 지정 돌연변이유발에 의해 변경된 DNA 및 펩티드 서열의 생성

비무작위 또는 지정된 돌연변이유발법을 사용하여 특정 영역에 특정 서열 또는 돌연변이를 제공할 수 있다. 이들 기 법은 예를 들어 단백질의 공지된 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는 변이체를 생성하는 데 사용 할 수 있다. 돌연변이를 위한 부위는 개별적으로 또는 시리즈로 변경할 수 있는데, 예를 들어 (1) 먼저 보존된 아미노 산으로 치환하고, 이어서 획득된 결과에 따라 더 활성인 아미노산으로 치환함으로써, (2) 표적 잔기를 결실시킴으로 써, 또는 (3) 지정 위치에 인접한 동일한 부류 또는 상이한 부류의 잔기를 삽입함으로써 또는 상기 (1) 내지 (3)을 병 용함으로써 변경시킬 수 있다.

알라닌 스캐닝 돌연변이유발법

알라닌 스캐닝 돌연변이유발법은 돌연변이유발을 위한 바람직한 위치 또는 도메인인 소정 단백질의 특정 잔기 또는 영역을 확인하기 위한 유용한 방법이다[참조: Cunningham 및 Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)]. 알라닌 스캐닝에서, 표적 잔기의 잔기 또는 군을 확인하고(예를 들어, 하전된 잔기, 예를 들어 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산(대개는 알라닌 또는 프로알라닌이 바람직함)으로 대체한다. 아미노산의 대체는 아 미노산과 세포외 또는 세포외의 주위 수생 환경과의 상호 작용에 영향을 미칠 수 있다. 상기 치환에 대한 기능적 민감 성을 나타내는 이들 도메인은 치환 부위 또는 치환 부위에 대해 추가의 변이체 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정 해진다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 위치가 미리결정되면, 돌연변이 그 자체의 특성은 미리결정할 필요가 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서 돌연변이의 성능을 최적화하기 위해, 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 유발법은 표적 코돈 또는 영역에서 수행할 수 있으며, 발현된 목적 단백질 서브유닛 변이체는 목적하는 활성의 최적 연합에 대해 스크리닝한다.

올리고뉴클레오타이드 매개된 돌연변이유발법

올리고뉴클레오타이드 매개된 돌연변이유발법은 DNA의 치환, 결실 및 삽입 변이체를 제조하기 위한 유용한 방법이다[참조: 예를 들어, Adelman 등, DNA 2: 183, 1983]. 개략적으로, 목적 DNA는 DNA 주형에 대해 돌연변이를 암호화 하는 올리고뉴클레오타이드를 하이브리드화시킴으로써 변경되는데, 상기 주형은 목적 단백질의 변경되지 않은 DNA 서 열 또는 천연 DNA 서열을 함유하는 플라스미드 또는 박테리오파지의 일본체 형태이다. 하이브리드화후, DNA 폴리 메라제를 이용하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 혼입하고, 목적 단백질 DNA에서 선택된 변경을 암호화할 주형의 전체적인 제2 상보성 스트랜드를 합성한다. 일반적으로, 길이가 25 뉴클레오타이드 이상인 올리고뉴클레오타이드를 사용 한다. 최적 올리고뉴클레오타이드는 돌연변이를 암호화하는 뉴클레오타이드(들)의 어느 한 측면 상에서 상기 주형에 완전 이 상보적인 12 내지 15개의 뉴클레오타이드를 보유한 것이다. 이는 상기 뉴클레오타이드가 일본체 DNA 주형 분자에 적 절하게 하이브리드화하는 것을 보장한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 문헌[참조: Crea 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 75: 5765 (1978)]에 기술된 것과 같은 공지된 기법을 이용하여 용이하게 합성된다.

카세트 돌연변이유발법

변이체를 제조하는 다른 방법인 카세트 돌연변이유발법은 문헌[Wells 등, Gene, 34: 315 (1985)]에 기술된 기법에 기초한다. 출발 물질은 돌연변이시킴에 단백질 서브유닛 DNA를 포함하는 플라스미드(또는 다른 벡터)이다. 상기 돌연변이시킴에는 단백질 서브유닛 DNA 내의 코돈(들)은 동일하다. 확인된 돌연변이 부위(들)의 각 측면에는 독특한 제한 엔도뉴클레아제 부위가 분명히 존재할 것이다. 이러한 제한 부위가 존재하지 않는다면, 이들은 목적 단백질 서 브유닛 DNA 내의 적절한 위치에 이들을 도입시키는 상기한 올리고뉴클레오타이드 매개된 돌연변이유발법을 이용하여 생장할 수 있다. 제한 부위를 상기 플라스미드 내로 도입한 후, 상기 플라스미드는 이들 위치에서 절단하여 선형으로 만든다. 제한 부위 사이이나 목적 돌연변이(들)를 함유하는 상기 DNA의 서열을 암호화하는 서열을 암호화하는 일본 체 올리고뉴클레오타이드는 표준 기법을 이용하여 합성한다. 2개의 스트랜드는 별도로 합성하며, 표준 기법을 이용하여 함께 하이브리드시킨다. 일본체 올리고뉴클레오타이드는 카세트들을 의미한다. 이 카세트는 선형화된 플라스미드의 단 부에 상응하는 3' 및 5' 단부를 보유하도록 디자인하여 플라스미드에 직접적으로 연결될 수 있도록 한다. 현재 이 플 라스미드는 돌연변이된 목적 단백질 서브유닛 DNA 서열을 함유한다.

복합 돌연변이유발법

또한, 복합 돌연변이유발법을 이용하여 돌연변이체를 생성할 수도 있다. 예를 들어, 일군의 상동체 또는 기타 관련 단핵질의 아미노산 서열을 정렬하는 것인데, 바람직하게는 가능한 최상의 상동성을 촉진하도록 정렬하는 것이 바람직하다. 정렬된 서열의 소정 위치에서 나타나는 모든 아미노산은 복합 서열의 축퇴성 세트들 생성하도록 선택할 수 있다. 변이체의 변형시킨 라이브러리는 핵산 수준에서 복합 돌연변이유발법으로 생성되되, 변형시킨 유전자 라이브러리에 의해 암호화된다. 예를 들어, 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물은 유전자 서열 내로 효소적으로 연결하여 상기 잠재 서열의 축퇴성 세트가 개개의 펩티드로서 발현가능하도록 하거나, 또는 축퇴성 서열의 세트들 함유하는 더 큰 융합 단핵질의 세트로서 발현가능하도록 한다.

펩티드 단편 또는 상동체 라이브러리를 스크리닝하기 위한 일차적인 처리 방법

생성된 돌연변이 유전자 생성물을 스크리닝하는 여러가지 기법이 당업계에 공지되어 있다. 큰 유전자 라이브러리를 스크리닝하는 기법은 종종 유전자 라이브러리를 복제가능한 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 벡터 라이브러리를 이용하여 적합한 세포를 형질전환시키는 단계 및 목적하는 활성을 검출할 수 있는 조건 하에서 상기 유전자를 발현시키는 단계를 포함하는데, 예를 들어 이 경우, 상호작용, 예를 들어 데코린 상호작용 폴리펩티드, 예를 들어 데코린 수용체에 대한 데코린의 결합, 또는 상호작용, 예를 들어 데코린 폴리펩티드와 후보 폴리펩티드의 상호작용은 생성물이 검출되는 유전자를 발현하는 벡터의 간편한 분리용 용이하게 한다. 후술하는 각각의 기법은 예를 들어 무작위 돌연변이 유발법에 의해 생성된 다수의 서열을 스크리닝하기 위한 고처리량 분석에 따라야 한다.

2 하이브리드 시스템

상기한 시스템(본원에 기술한 다른 스크리닝 방법과 함께)과 같은 2 하이브리드 분석을 이용하여 데코린 상호작용자와 결합하는 데코린 폴리펩티드의 단편 또는 유사체를 동정할 수 있다. 이들은 작용물질, 수퍼작용물질 및 길항물질들을 포함할 수 있다.

디스플레이 라이브러리

스크리닝 분석에 대한 한 접근법에서, 후보 펩티드는 세포 또는 바이러스 입자의 표면 상에서 디스플레이되며, 디스플레이된 단핵질에 의해 적합한 수용체 단핵질에 결합하는 특정 세포 또는 바이러스 입자의 능력은 '패널 분석(panni ng assay)'에서 검출하였다. 예를 들어, 유전자 라이브러리는 박테리아 세포의 표면 및 단핵질을 위한 유전자 내로 클로닝하고, 생성된 융합 단핵질은 패널에 의해 검출된다[참조: Ladner 등, WO 88/06630; Fuchs 등, (1991) Bio/Tech nology 9: 1370-1371; 및 Goward 등, (1992) TIBS 18: 136-140]. 유사한 방식으로, 검출가능하게 표지된 리간드를 이용하여 잠재적으로 기능적인 펩티드 상동체에 대해 스크어링할 수 있다. 형광 표지된 리간드, 예를 들어 수용체를 이용하여 리간드 결합 활성을 보유하고 있는 상동체를 검출할 수 있다. 형광 표지된 리간드의 이용은 형광 현미경 하에서 세포를 시각적으로 조사하고 분리할 수 있게 해주거나, 세포의 형태를 형광 활성화된 세포 분류기에 의해 분리할 수 있도록 해준다.

유전자 라이브러리는 바이러스 입자의 표면 상에서 융합 단핵질로서 발현될 수 있다. 예를 들어, 균사 파지 시스템에서, 외래 단핵질 서열은 감염성 파지의 표면 상에서 발현될 수 있어서 2가지의 중요한 잇점을 제공한다. 첫째, 이들 파지는 10¹³ 파지/서열을 훨씬 상회하는 농도에서 친화성 매트릭스에 적용될 수 있으며, 다수의 파지를 한번에 스크리닝할 수 있다. 둘째, 각각의 감염성 파지는 그들의 표면 상에서 유전자 생성물을 디스플레이하기 때문에, 친화성 매트릭스로부터 낮은 수율로 특정 파지가 회수되는 경우, 상기 파지는 다른 라운드의 감염에 의해 증폭될 수 있다. 거의 동일한 이, 폴리 균사 파지 M13, fd., 및 f1 균은 파지 디스플레이 라이브러리에서 가장 흔하게 사용되는 것들이다. 파지 g III 또는 gVIII 코트 단백질중 하나를 사용하여 바이러스 입자의 궁극적인 패키징을 방해하지 않으면서 융합 단핵질을 생성할 수 있다. 외래 에피토프는 pIII 및 이 에피토프가 결합된 파지로부터 회수된 이러한 에피토프를 보유하는 파지의 NH₂ 말단 단부에서 발현될 수 있다[참조: Ladner 등, WO 90/02900; Garrard 등, WO 92/09690; Marks 등, (1992) J. Biol. Chem. 267: 16007-16010; Griffiths 등 (1993) EMBO J 12: 725- 734; Clackson 등 (1991) Nature 352: 624-628; 및 Barbas 등 (1992) PNAS 89: 4457-4461].

통상적인 방법은 펩티드 융합 파트너로서 이, 콜리의 말토즈 수용체(의막 단백질, LamB)를 이용한다[참조: Charbit 등 (1986) EMBO 5, 3029-3037]. 올리고뉴클레오타이드는 LamB 유전자를 암호화하는 플라스미드 내로 삽입하여 상기 단핵질의 외세포성 투프중 하나내로 융합된 펩티드를 생성한다. 이들 펩티드는 리간드에 대한 결합, 예를 들어 항체에 대한 결합에 이용할 수 있으며, 상기 세포가 동물에게 투여되는 경우 면역 반응을 유발할 수 있다. 다른 세포 표면 단백질, 예를 들어 OmpA[참조: Schorr 등 (1991) Vaccines 9, pp. 387-392], Phc[참조: Agerberg 등 (1991) Gene 88, 37-45] 및 PAL(Fuchs 등 (1991) Bio/Tech 9, 1369-1372] 뿐만 아니라 대형 박테리아 표면 구조물은 펩티드 디스플레이를 위한 비허클로서 기능할 수 있다. 펩티드는 펠릭스(pilus, 박테리아간에 유전 정보를 교환하기 위한 관)을 형성하기 위해 폴리머라이징하는 단백질인 필린(pilin)에 융합할 수 있다[참조: Thiry 등, (1989) Appl. E

nvirion. Microbiol. 55, 984-993]. 다른 세포와의 상호작용에서 그의 역할때문에, 펩티드는 세포의 환경에 대한 펩티드의 제시를 위한 유용한 지지체를 제공한다. 펩티드 디스플레이를 위해 사용된 다른 대형 표면 구조물은 박테리아 운동 기관인 편모이다. 서브유닛 단백질인 플라젤린에 대한 펩티드의 융합은 속주 세포 상에 펩티드 사본의 조밀한 융합을 제공한다[참조: Kwajima 등, (1988) Bio/Tech. 6, 1080-1083]. 또한, 기타 박테리아 중의 표면 단백질은 펩티드 융합 파트너로 기능한다. 그 예로는 스타필로코쿠스 단백질 A 및 네이세리아(*Neisseria*)의 외막 프로테아제 IgA이다[참조: Hanssen 등 (1992) J. Bacteriol. 174, 4239-4245 및 Klausner 등 (1990) EMBO J. 9, 1991-1998].

상기한 분자 파지 시스템 및 LamB 시스템에서, 펩티드와 그의 암호화 DNA 사이의 물리적인 연결은 표면 상에 상기 펩티드를 보유하는 입자(세포 또는 파지)내 DNA의 오염에 의해 발생한다. 펩티드를 포획하는 것은 입자와 그 내부의 DNA를 포획하는 것이다. 대체적인 방법은 DNA 결합 단백질인 LacI를 이용하여 펩티드와 DNA를 연결하는 것이다[참조: Cull 등 (1992) PNAS USA 89: 1865-1869]. 이 시스템은 3' 단부에 올리고뉴클레오타이드 클로닝 부위를 보유하는 LacI 유전자를 함유하는 플라스미드를 사용한다. 아라비노스에 의한 조절된 유도 하에서, LacI-펩티드 융합 단백질이 생성된다. 이 융합은 LacO 오퍼레이터(LacO)로 공지된 짧은 DNA 서열에 결합할 수 있는 LacI의 자연적인 능력을 유지한다. 상기 발현 플라스미드 상에 LacO의 사본 2개를 인스톨링함으로써 LacI-펩티드 융합은 이를 발현하는 플라스미드에 견고하게 결합한다. 각각의 세포내의 상기 플라스미드는 단지 단일 올리고뉴클레오타이드 서열이고, 각각의 세포는 단지 단일 펩티드 서열을 발현하기 때문에, 상기 펩티드는 그들의 합성을 유도하는 DNA 서열과 특이적이고, 안정하게 회합한다. 상기 라이브러리의 세포는 부드럽게 용해되며, 상기 펩티드-DNA 복합체는 고정화된 리포터의 매트릭스에 노출되어 활성 펩티드를 함유하는 복합체를 복합한다. 이어서, 회합된 플라스미드 DNA는 증폭 및 DNA 서열결합을 위해 세포내로 도입하여 펩티드 리간드의 실재를 확인한다. 상기 방법의 실용성을 입증하기 위해, 도 2에 나타낸 바와 같이 이루어진 대형 무작위 라이브러리를 제조하고 오퍼로이드 펩티드 다나노스핀 B에 대해 생성된 모노클로날 항체에 대해 선택한다. 일군의 펩티드를 회수하였는데, 모두는 다나노스핀 B의 6-관기부에 상응하는 공통 서열에 의해 판별되어 있다[참조: Cull 등 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89-1869].

중중 펩티드-온-플라스미드(peptides-on-plasmids)라 칭하는 이 방법은 2가지 중요한 점에서 상기 파지 디스플레이와 다르다. 첫째, 상기 펩티드는 융합 단백질의 C-말단에 부착하여 유비 카르복시 말단을 보유하는 펩티드로서 라이브러리 펩티드의 디스플레이를 초래한다. 둘다 분자 파지 코트 단백질인 pIII 및 pVIII는 그들의 C 말단을 통해 파지에 고정되며, 게스트 펩티드는 외향 N-말단 도메인 내로 위치한다. 몇몇 디자인에서, 파지 디스플레이된 펩티드는 융합 단백질의 아미노 말단 우측에 존재한다[참조: Cwirla 등 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-6382]. 두번째 차이는 상기 라이브러리에 실질적으로 존재하는 펩티드의 군집에 영향을 미치는 생물학적 편향이다. LacI 융합 단백질은 숙주 세포의 세포조로 한정된다. 파지 코트 융합은 숙주에서 세포조로 약간 노출되나, 내막을 통해 주변 세포질 구획으로 신속하게 분비되는데, 이때 N-말단과 함께 그들의 C-말단 소수성 영역에 의해 막에 고정된 상태를 유지하며, 파지 입자의 조립을 기다리면서 주변 세포질로 나오는 펩티드를 함유한다. LacI 및 파지 라이브러리의 펩티드는 상이한 단백질분해 활성에 대한 그들의 노출로 인해 현저히 다를 수 있다. 파지 코트 단백질은 내막을 가로지르는 수송 및 파지로의 혼입에 대한 전구로서 시그널 펩티드계 프로세싱을 필요로한다. 특정 펩티드는 이들 프로세스에 대한 유해 효과를 나타내며, 라이브러리내에서 적게 나타난다[참조: Gallop 등 (1994) J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251]. 이들 특징적인 편향은 LacI 디스플레이 시스템에서의 인자는 아니다.

제조할 무작위 라이브러리에서 사용할 수 있는 작은 펩티드의 수는 방대하다. 10^7 내지 10^9 의 독립적인 클론으로 이루어진 라이브러리가 보통 제작된다. 10^{11} 제조함제로 이루어진 대형 라이브러리가 제작되어 왔으나, 이러한 크기의 클론 라이브러리에 대해서는 실용적인 한계에 부딪히고 말았다. 이러한 라이브러리 크기 면에서의 한계는 숙주 박테리아 세포 내로 무작위 편향을 함유하는 DNA를 형질전환시키는 단계에서 발생한다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 폴리복합체 내에서 초기 펩티드의 디스플레이에 기초한 시험관내 시스템이 최근에 개발되었다. 이 디스플레이 라이브러리는 현재 이용할 수 있는 파지/파지미드 또는 플라스미드 라이브러리 보다 3 내지 6배 이상 더 큰 라이브러리를 생성할 수 있는 가능성을 보유한다. 또한, 상기 라이브러리의 구성, 펩티드의 발현 및 스크리닝은 전체적으로 무세포 형식으로 수행된다.

이 방법의 한 적용[참조: Gallop 등 (1994), J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251]에 있어서, 10^{12} 대카펩티드를 암호화하는 DNA 라이브러리에서 사용하며, 이 폴리 S30 내에서 발현된 라이브러리는 시험관 내서 전사/해독 시스템과 커플링시킨다. 조건은 mRNA 상에 리보솜을 유지시킬 수 있고, 폴리솜내에 실질적인 비율의 RNA의 축적을 유발하며, 여전히 그들의 암호화 RNA에 연결된 초기 펩티드가 스크리닝되는 방식과 동일한 방식으로 고정화된 수용체 상에서 회화성 정제되도록 충분히 견고하다. 결합된 복합체로부터 RNA를 회수하고, cDNA로 전환시키고, PCR로 증폭시켜 합성 및 스크리닝을 위한 다 라운드를 위한 주형으로 사용한다. 폴리솜 디스플레이 및 펩티드 동정을 위한 방법과 병용하여 사용할 수 있다. 몇몇의 스크리닝후, 풍부한 폴리솜 풀로부터 유해한 cDNA는 파지미드 배터 내로 클로닝한다. 이 배터는 코트 단백질에 융합된 펩티드를 디스플레이하는 펩티드 발현 벡터 및 펩티드 동정을 위한 DNA 서열 결정 벡터 둘 다로서 기능한다. 파지상에서 폴리솜 유도된 펩티드를 발현함으로써, 이러한 방식의 회화성 선택 과정, 또는 파지 ELISA에서 결합 활성 또는 완전 파지 ELISA에서 결합 특이성에 대해 개개의 클론에 대한 펩티드 분석을 계속할 수 있다[참조: Barrett 등 (1992) Anal. Biochem. 204, 357-364]. 활성 펩티드의 서열을 동정하기 위해, 파지미드 숙주에 의해 생성된 DNA의 서열을 결정한다.

2차 스크리닝

상기한 고처리량 분석 이후에 예를 들어, 당업자에 의한 작동물질과 길항물질의 구별을 가능하게 할 추가의 생물학적 활성을 확인하기 위해 2차 스크리닝을 수행할 수 있다. 사용한 2차 스크리닝 유형은 테스트가 요구되는 목적 활성에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 소경의 단백질과 그의 각각의 리간드 사이의 상호작용을 억제할 수 있는 능력을 사용하여 상기 일차 스크리닝중 하나는 통해 분리된 일군의 펩티드 단편으로부터 길항물질을 확인하는 분석법을 개발할 수 있다.

따라서, 단편 및 유사체를 생성하는 방법 및 이들의 활성을 테스트하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일단 소경 서열의 코어가 확인되면, 유사체 또는 단편을 얻는 것은 당업자에게는 일상적인 일이다.

본 발명은 후술하는 비제한적인 실시예에 의해 추가 기술될 것이다. 본 출원에 인용된 모든 참고 문헌(서적, 특허 공보, 특허 출원 공보 및 동시 계류중인 특허 출원)의 내용은 전적으로 참고 인용된 것이다.

실시예

데코린 구성물의 생성

1.7 kb 인간 데코린 cDNA를 함유하는 pGEMDec는 BspHI를 이용하여 부분적으로 분해하고, 어닐링된 올리고뉴클레오타이드 BSPHXHO1 및 BSPHXHO2(각각 CATGCTCGAGCCGCCAC(서열번호 1) 및 CATGGTGGCGGCTCGAG(서열번호 2))를 인간 데코린 번역 개시 위치의 직 상류의 BspHI 위치에 연결하였다. 이러한 조작은 최적 코작 리보솜 결합 위치 및 XhoI 클로닝 위치를 생성하였다. 이어서, 이 플라스미드는 돌연변이시켜 인간 데코린 번역 코돈의 2bp 하류에 XhoI 단편을 도입하였다. 이어서 전체 인간 데코린 암호 서열을 함유하는 1.1 kb XhoI 단편을 분리하고, XhoI로 개방한 염소 벡터 카제인 발현 벡터 BC451에 연결하여 BC543 인간 데코린 유방 발현 카세트를 생성하였다. 이 플라스미드는 완전히 서열결정하여 배향 및 가능한 돌연변이를 입증하였다.

주사용 단편의 제조

염소 벡터 카제인-인간 데코린 발현 카세트는 NotI를 이용하여 완전히 분해하여 플라스미드 백본으로부터 분리하였으며, '위자드(Wizard)' 법을 이용하는 미량주입용으로 제조하였다. 플라스미드 DNA(100 µg)는 NotI를 이용하여 완전히 분해하여 벡터 백본으로부터 분리하였다. 이어서, 분해물은 전개 완충액으로 1X TAE(매니아티스, 디., 프리치, 이, 에프., 및 썬브룩, 제이. 1983, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory)를 이용하여 아가로스 겔 내에서 전기영동하였다. 상기 발현 카세트에 상응하는 DNA 단편을 함유하는 겔의 영역은 UV 광선(장파)을 이용하여 시각화하였다. 소경의 DNA를 함유하는 밴드는 절제하고, 투석 액으로 이전하고, DNA는 1X TAE 내에서 전기 용출에 의해 분리하였다.

전기 용출후, DNA 단편은 농축하고, 제공된 프로토콜에 따라 '위자드 DNA 클리닝 시스템'(프로메가 카탈로그 번호 A778)을 이용하여 세정하고, 미량주입 완충액(10 mM 트리스 pH 7.5, EDTA 0.2 mM) 125 µl 내로 용출하였다. 단편 농도는 비료용 아가로스 겔 전기영동에 의해 평가하였다. 미량주입 단편 스톱 용액의 추정 농도는 150 ng/ml 였다. 스톱 용액은 전체 주입 직전에 미량주입 완충액 내에서 희석하여 최종 농도를 1.5 ng/ml로 만들었다.

미량주입

CD1 암컷 마우스는 파인테라시키고, 수정란은 난관으로부터 회수하였다. 이어서, 수컷 전핵은 미량주입 완충액 내에서 희석한 DNA와 함께 미량주입하였다. 미량주입된 배아는 CZB 배지 내에서 하루밤 배양하거나, 가임신 수용체 CD1 암컷 마우스의 난관내로 즉시 이식하였다. 20 내지 30개의 2-세포 배아 또는 40 내지 50개의 1-세포 배아는 각각의 암컷 수용체에 이식하여 출산 예정일까지 진행시켰다.

파운더 동물의 동정

계놈 DNA는 이소프로판올로 침전시켜 포리 조각으로부터 분리하였으며, 치킨 벡터-글로빈 인슐레이터 DNA 서열의 존재에 대해 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 분석하였다. PCR 반응에서, 계놈 DNA 약 250 ng은 PCR 완충액(20 mM 트리스 pH 8.3, 50 mM KCl 및 1.5 mM MgCl₂, 100 µM 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 각각의 프라이머, 농도 600 nM) 50 µl 내에 Taq 폴리머라제 2.5 유닛과 함께 희석하고, 다음과 같은 온도 프로그램을 이용하여 처리하였다:

1 사이클 94°C 60초

5 사이클 94℃ 30초

58℃ 45초

74℃ 45초

30 사이클 94℃ 30초

55℃ 30초

74℃ 30초

프라이머 세트:

GBC 332: TGTGCTCCTCTCCATGCTGG(서열 번호 3)

GBC 386: TGGTCTGGGGTGACACATGT(서열 번호 4)

마우스 착유

암컷 마우스는 새끼를 자연적으로 출산하도록 하였으며, 일반적으로 분만후 7일 및 9일에 착유하였다. 마우스는 착유 전 약 1 시간 동안 그들의 새끼로부터 분리하였다. 한시간 동안의 유지 기간 후, 마우스에게 25 개이지 바늘을 이용하여 멸균 인산염 완충 염수내의 5 IU 옥시토신을 복강내 주입하여 락테이트를 유도하도록 하였다. 호르몬 주입하고, 옥시토신의 효과가 발현될 동안 1 내지 5분 동안 대기하였다.

고무 스펀저로 봉인되어 있고, 내부에 18 개이지 바늘이 삽입되어 있으며, 한 바늘의 허브 단부가 인간 심장 펌프에 연결된 고무 튜브 내에 삽입된 15 ml 원추형 튜브로 이루어진 흡입 및 수집 시스템을 이용하여 착유하였다. 다른 바늘의 허브 단부는 15 ml의 원추형 튜브내에 위치한 개개의 에펜드르프내로 착유할 목적으로 마우스의 유두(한번에 하나씩)에 위치시켰다. 에펜드르프 튜브는 각각의 샘플 수집 후에 교환하였다. 착유는 150 μ l 이상의 밀크가 얻어질 때까지 계속하였다. 수집후, 마우스는 그들의 새끼에게로 돌려보냈다.

단백질 분석

문헌[참조: Harlow 및 Lane, 1998. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory]에 기재된 바와 같이, 인간 테코린 특이성 토끼 폴리클로날 항체(케미콘 카탈로그 번호 AB1 909)를이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

결과

형질전환 마우스

총 805개의 배아에 미량주입하였다. 624개(77.5%)의 배아는 미량주입에도 생존하였으며, 537개는 20마리의 가임신 수용체 마우스에 이식하였다. 총 142개의 파 운더 마우스가 태어났으며(이식된 배아의 26.4%), 인슐레이서 서열에 특이적인 프라이머를 이용하는 PCR에 의해 분석하였다.

총 15마리의 형질전환 파운더를 동정하였으며(10.5%, 미량주입된 배아의 1.86%), 이들중 6마리는 교배용으로 선택하였다. 이들 계통에서 밀크내 인간 테코린 발현은 하기 표 1에 요약하였다.

[표 1]

파운더(성)	PCR 양성 후대 (암컷만 분석함)	밀크중 인간 테코린 레벨 (mg/ml) 웨스턴 블롯으로 분석함
14(F)		0.25
22(F)	227	0.1

36(F)		1-1.5
62(F)	215	2-4
73(M)	152	사용불능 5-10
102(F)	269	0.5 1-1.5

밀크에서 발현된 테코린의 글리코실화

테코린은 BC543 구성물을 함유하는 형질전환 마우스의 밀크 내에서 높은 수준으로 발현하였다. 6개의 계통중 4개는 1 mg/ml를 초과하는 수준으로 발현하였다. 낮은 수준으로 발현된 2개의 계통중에서, 하나는 명백히 모자이크(계통 14)였는데, 그 이유는 후대로의 트랜스유전자 이식이 관찰되지 않았기 때문이다. 형질전환법으로 발현된 테코린에게서 관찰된 한가지 놀라운 사실은 이것이 SDS-PAGE 상에서 약 45 kd 내지 53 kd 사이에서 상대적으로 밀집한 세트의 밴드로 이동하는 반면, 포유류 세포 배양물에서 유도된 테코린은 약 60 kd 내지 120 kd에 걸쳐 희미한 밴드로 이동한다는 것이다. 형질전환법으로 발현된 테코린의 이러한 이동 패턴은 글루코사미노글리칸 사슬을 함유하지 않는 분자와 일치하는 것이다.

인간 테코린은 형질전환 동물의 밀크 내에서 높은 수준(>1 mg/ml)으로 발현되었다. 형질전환법으로 발현된 인간 테코린은 글루코사미노글리칸 측쇄를 함유하지 않았다. 형질전환법으로 발현된 인간 테코린의 이러한 예상치 못한 특성은 매우 이질적인 것이며, 치료적 재조합 단백질의 필요한 균일한 생성 특성을 획득하는데 장애물이었다. 또한, 글루코사미노글리칸 사슬은 치료적 용도로 사용되는 경우, 인간 테코린의 활성에 불필요한 것으로 생각된다.

형질전환 염소의 생성 및 특성 규명

파운더(F 0) 형질전환 염소는 구성물(예를 들어, 염소 베타-가제인 유전자의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 인간 테코린 유전자를 함유하는 BC355)을 미량주입한 수정된 염소란의 이식에 의해 제조할 수 있다. 이 절에서 이용한 방법은 형질전환 염소를 생성하기 위해 사용한 방법을 이용할 수 있다.

염소 종 및 번식

스위스 산 염소, 예를 들어 알파인, 사넨 및 토겐베르크가 형질전환 염소의 생성에 유용하다.

본 절은 형질전환 염소를 생성하는데 필요한 단계를 개략적으로 설명한다. 이들 단계는 암컷 염소의 과잉배란, 수정 능력이 있는 수정과 교배 및 수정된 배아의 수집을 포함한다. 일단 수집되면, 1-세포 수정된 배아의 전체에 DNA 구성물을 미량주입한다. 하나의 공여체 암컷으로부터 유도된 모든 배아는 함께 유지하고, 가능한한 단일 수용체 암컷으로 이식하였다.

염소 과잉배란

공여체에서 발정기는 6 mg의 퍼하 노르세스토메트 귀 이식물(신크로메이트-B, 켄자스 오버랜드 파크의 세바 래버러토리즈, 인크.)을 이용하여 0일로 동기화하였다. 첫번째 7일 내지 9일후에 프로스타글란딘을 주입하여 프로게스테론의 내인성 합성을 중지시켰다. 이식물의 삽입후 13일에 투여하기 시작하여 총 18 mg의 여포 자극 호르몬(FSH-뉴지 지 케일위스의 세팅 코포데이션)을 3일에 걸쳐 1일 2회 주사하여 투여하였다. 상기 이식물은 14일에 제거하였다. 이식물을 제거하고 24시간후, 공여체 동물은 2일에 걸쳐 생식능력 있는 수정과 수차례 교배하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenol, 1195-1205 (1990)].

배아 수집

배아 수집을 위한 수술은 출산후 2일째(또는 이식물 제거후 72 시간후)에 시술하였다. 과잉배란된 양은 수술 36시간 전에 식물 및 물로부터 제거하였다. 투여량은 디아세팠 0.8 mg/kg이었다.

(발표(등록상표명)) IV를 투여한 직후, 케타민(케테넷) IV 5.0 mg/kg을 투여하였다. 기관내 튜브에 의해 2 l/min의 산소에서의 수술중에 할로탄(2.5%)을 투여하였다. 중앙 개복술을 통해 생식관을 외제화하였다. 황체, 직경이 6 mm 보다 더 큰 파괴되지 않은 여포 및 난소 낭포는 계수하여 과잉배란 결과를 평가하였으며, 난관 세척에 의해 수집되어야

하는 배아의 수를 예측하였다. 캐블라는 난관 입구에 위치시켰으며, 3.0 프롤렌의 단일 일시 결찰사를 이용하여 고정시켰다. 20 개이지 반을 자궁관 집점으로부터 약 0.5 cm 떨어진 자궁 내에 위치시켰다. 멸균 완충 염수(PBS) 10 내지 20 ml를 난관에 삽입된 캐블라를 통해 흘려보냈으며, 페트리 접시에 수집하였다. 이 과정은 반대편에서도 동일하게 수행하였으며, 이어서 생식관은 복부내에 재위치시켰다. 봉합 이전에, 멸균 염수 클리세올 용액 10 내지 20 ml를 복부 공동에 쏟아부어 집착을 예방하였다. 백선은 2.0 폴라리독사는 또는 수프라미드의 단순 단독봉합하였으며, 피부는 멸균된 환부 클립으로 봉합하였다.

염소 수정란은 일체현미경 상에서 PBS 난관 세척물로부터 수집하였으며, 이어서 시그마에서 시판되는 10% 소 혈청 알부민을 함유하는 램의 F12 배지(미주리 세인트 루이스의 시그마)로 세척하였다. 전핵이 보이는 경우, 배아는 즉시 미량주입하였다. 전핵이 보이지 않는 경우, 배아는 단기간 동안 10% FBS를 함유하는 램의 F12 내에서 37°C에서 배양하였는데, 배양은 공기중 5% CO₂ 를 함유하는 가슴 가스실에서 수행하였으며, 전핵이 보일때 까지 수행하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenology, pp. 1195-1205 (1990)].

미량주입 과정

1-세포 염소 배아는 유리 함오 슬라이드상의 오일 아래 미량의 배지내에 위치시켰다. 2개의 볼 수 있는 전핵을 보유하는 수정란은 노르마스키 렌즈를 이용하고 고정단을 보유하는 제이스 직접 현미경에서 불꽃 처리한 유리 마이크로 피펫으로 고정화하였다. 전핵에는 주사용 완충액(트리스-EDTA)내 소량의 DNA 주성물, 예를 들어 염소 베타-카제인 유전자의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 인간 대코린 유전자를 함유하는 BC355를 미세 유리 마이그로니들을 이용하여 미량주입하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenology, pp. 1195-1205 (1990)].

배아 발생

미량주입후, 생존하는 배아는 10% FBS를 함유하는 램의 F12의 배양물 내에 위치시켰으며, 이어서 공기중 5% CO₂ 를 함유하는 37°C의 가슴 기체 챔버 내에서 항온처리하였는데, 배아 이식을 위해 수용체 동물이 준비될 때까지 항온 처리하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenology, pp. 1195-1205 (1990)].

수용체의 제조

수용체 동물에서 발정기의 동시화는 6 mg의 노르게스토메트 쿼 이식물(신크로메이트-B)에 의해 유도하였다. 이식물을 삽입하고 13일째에, 동물에게 시그마에서 구입한 임신한 암컷 혈청 고나도트로핀(PMSG)을 단일 비과잉배관 주입(400 IU)하였다. 수용체 암컷은 정관절제수술한 수컷과 교배시켜 발정기를 동시화하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenology, pp. 1195-1205 (1990)].

배아 이식

하나의 공여체 암컷으로부터 유래한 모든 배아는 함께 유지하였으며, 가능하면 단일 수용체 내에 이식하였다. 시술 과정은 상기한 배아 수집 과정과 유사하나, 난관은 캐블라라지 않았으며, 배아는 10% FBS를 함유하는 최소량의 램의 F12 내에서 유리 마이크로피펫을 이용하여 설모에 의해 난관 루멘 내로 이식하였다. 난소 상에 6 내지 8개의 배관점을 보유한 동물은 수용체로서 적합하지 않은 것으로 간주 하였다. 절개 부분의 봉합 및 수술후 처리는 공여체 동물에 대해 수행한 것과 동일한 방식으로 시술하였다[참조: Selgrath 등, Theriogenology, pp. 1195-1205 (1990)].

임신 및 분만의 모니터링

임신 여부는 지속적인 발정기의 첫째날이 지나구 45일 후에 초음파검사법으로 결정하였다. 110일째에, 두번째 초음파 검사를 수행하여 임신 여부를 확인하고, 태아 스트레스를 평가하였다. 130일째에, 임신한 수용체 암컷은 과산포 독소 및 글로스테리디움 Camp;D로 백신화하였다. 셀레늄 및 비타민 E(보-세)는 근육내 주사하고, 이베르메кт린은 피하 주사하였다. 145일째에 두어는 클린 스톨로 이동시키고, 약 147일째에 출산을 유도하기 이전에 이러한 환경에 순응하게 하였다. 분만은 147일째에 PGF2a(투타라이즈(등록상표)), 미시간 카라마주의 일존 컴퍼니) 40 mg를 이용하여 유도하였다. 이 주사는 근육내로 2회 실시하였으며, 첫번째는 20 mg를 투여하고, 이어서 4 시간 후에 20 mg를 투여하였다. 147일째에 투타라제(등록상표)를 최초 주입한 날 암컷은 하루 종일 주야로 관찰하였다. 관찰은 두번째 날 아침이 시작되고 매 30분 마다 수행하였다. 분만은 첫번째 주사후 30분 내지 40분 사이에 일어났다. 분만후, 암컷은 착유하여 초유를 수집하였으며, 태반의 통과를 확인하였다.

F₀ 동물의 형질전환 특성의 입증

형질전환 F₀ 동물에 대해 선별하기 위해, 개능 DNA를 2개의 상이한 세포주로부터 분리하여 임의의 모자이크 형질전환 동물의 누락을 회피하였다. 모자이크 동 물은 모든 세포에서 트랜스유전자의 하나 이상의 사본을 보유하지 않는

임의의 염소로 정의한다. 따라서, 귀 조직 샘플(중배엽) 및 혈액 샘플은 게놈 DNA의 분리를 위해 2살된 F₀ 동물로부터 취했다[참조: Lacy 등, *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1986); 및 Herrmann 및 Frischauf, *Methods Enzymology*, 152: pp. 180-183 (1987)]. 상기 DNA 샘플은 무작위 프라이밍된 인간 테코린 cDNA 프로브[참조: Feinberg 및 Vogelstein, *Anal. Biochem.*, 132: pp. 6-13 (1983)]을 이용하는 서던 블롯[참조: Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 5201-5205 (1980)] 및 인간 테코린 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 폴리머라제 연쇄 반응[참조: Gould 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: pp. 1934-1938 (1989)]에 의해 분석하였다. 분석 감도는 제세포의 10%중 트랜스유전자의 1개의 사본이 검출되도록 상정하였다.

생성 군(production herd)의 생성 및 선별

상기 기술된 과정을 이용하여 형질전환 파운더(F₀) 염소 뿐만 아니라 다른 형질전환 염소를 생성하였다. 예를 들어, 형질전환 F₀ 파운더 염소는, 암컷인 경우, 사육하여 밀크를 생산하도록 하였으며, 수컷 파운더인 경우, 형질전환 암컷 자손을 생산하도록 하였다. 이 형질전환 파운더 수컷은 비형질전환 암컷을 사육하여 형질전환 암컷 자손을 생산하게 할 수 있다.

트랜스유전자의 전달 및 관련 특성

염소 계통에서 소경 트랜스유전자의 전달은 귀 조직 및 혈액 내에서 PCR과 서던 블롯트 분석에 의해 분석하였다. 예를 들어, 파운더 암컷 및 3마리의 형질전환 자손의 서던 블롯트 분석은 세대간 사본수의 변화 또는 재배열을 나타내지 않았다. 서던 블롯은 인간 테코린 cDNA 프로브를 이용하여 탐침하였다. 블롯은 베타스코프 63에서 분석하였으며, 사본수는 트랜스유전자와 염소 베타 카제인 내인성 유전자를 비교하여 결정하였다.

발현 레벨의 특성

형질전환 동물의 밀크 내에서 형질전환 단백질의 발현 수준은 효소 분석 또는 웨스턴 블롯을 이용하여 결정하였다.

본원에 인용한 모든 문헌 및 특허는 참고로 인용한 것이다. 다른 구체예는 후술하는 청구의 범위에서 확인할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

형질전환법으로 생성된 테코린 제제.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 테코린이 인간 테코린인 제제.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 테코린이 형질전환 동물에서 생성되는 것인 제제.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 테코린이 형질전환 포유류에서 생성되는 것인 제제.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 테코린이 형질전환 육상 동물에서 생성되는 것인 제제.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 테코린이 형질전환 염소에서 생성되는 것인 제제.

청구항 7.

제1항에 있어서, 상기 형질전환법으로 생성된 테코린은 GAG 사슬이 결핍된 것인 제제.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 형질전환법으로 생성된 테코린이 형질전환 포유류의 유선에서 제조되는 것인 제제.

청구항 9.

형질전환법으로 생성된 테코린 제제로서, 상기 제제내 테코린 분자의 30% 미만이 GAG 사슬을 보유하는 것인 제제.

청구항 10.

데코린의 발현을 유도하는 트랜스유전자를 포함하는 형질전환 유기체를 제공하는 단계;

상기 트랜스유전자를 발현시키는 단계; 및

상기 유기체로부터 또는 상기 유기체에 의해 생성된 생성물로부터 형질전환법으로 생성된 데코린 제제를 회수하는 단계

를 포함하는 형질전환 데코린 제제의 제조 방법.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 데코린이 인간 데코린인 방법.

청구항 12.

제10항에 있어서, 상기 데코린이 형질전환 동물에서 생성되는 것인 방법.

청구항 13.

제10항에 있어서, 상기 데코린이 형질전환 포유류에서 생성되는 것인 방법.

청구항 14.

제10항에 있어서, 상기 데코린이 형질전환 축산 동물에서 생성되는 것인 방법.

청구항 15.

제10항에 있어서, 상기 데코린이 형질전환 염소에서 생성되는 것인 방법.

청구항 16.

제12항에 있어서, 상기 형질전환법으로 생성된 데코린은 GAG 사슬이 결핍되어 있는 것인 방법.

청구항 17.

제10항에 있어서, 상기 형질전환법으로 생성된 데코린이 형질전환 동물의 유선에서 제조되는 것인 방법.

청구항 18.

형질전환 포유류의 밀크 내에 이종 데코린을 포함하는 형질전환 제제를 제공하는 방법으로서, 형질전환 동물의 배선 내로 데코린 단백질 암호화 서열을 도입하여 프로모터 서열에 작동가능하게 연결하고, 유선 상피 세포 내에서 상기 단백질 암호화 서열을 발현시켜 상기 형질전환 포유류로부터 밀크를 얻고, 상기 포유류의 밀크 내로 데코린을 분비시켜 상기 제제를 얻는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 19.

형질전환 데코린을 발현하고, 이로부터 형질전환 데코린 제제를 얻을 수 있는 형질전환 유기체.

청구항 20.

치료 유효량의 형질전환 데코린 또는 형질전환 데코린 제제와 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 21.

형질전환법으로 생성된 인간 데코린 및 1종 이상의 다른 영양 성분을 포함하는 제제.

청구항 22.

데코린이 필요한 개체에게 형질전환법으로 생성된 데코린 또는 형질전환 데코린 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 개체에게 데코린을 제공하는 방법.

청구항 23.

제22항에 있어서, 상기 개체가 암을 앓고 있는 개체인 방법.

청구항 24.

제22항에 있어서, 상기 개체가 침입성 피부 상해를 앓고 있는 개체인 방법.

요약

본 발명은 형질전환법으로 생성된 테코린, 형질전환법으로 생성된 테코린의 제조 방법 및 이용 방법에 관한 것이다.